NanoFrontier *eLD* 操作手順説明書

（株）日立ハイテクノロジーズ

那珂アプリケーションセンタ

お願い

本書は、お客様が日常の測定作業でお使いになる基本的な機能の説明のみを抜粋した簡易的な操作マニュアルです。安全上および使用上の注意、保守点検方法、およびトラブルシューティングなどは、付属の取扱説明書に記載してあります。ご使用の際は、事前に取扱説明書をよくお読みいただき、製品を正しくご使用くださいますようお願いいたします。

1-1 ソフト立ち上げ

NanoFrontier eLD での測定に必要なソフトの立ち上げについて説明します。

(MS に関しては、真空排気が完了していることが前提となります。)

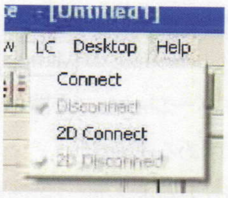
Auto Sequence ソフトウェアを用いて測定を行う手順について示します。

Auto Sequence ソフトウェアの起動

⇩

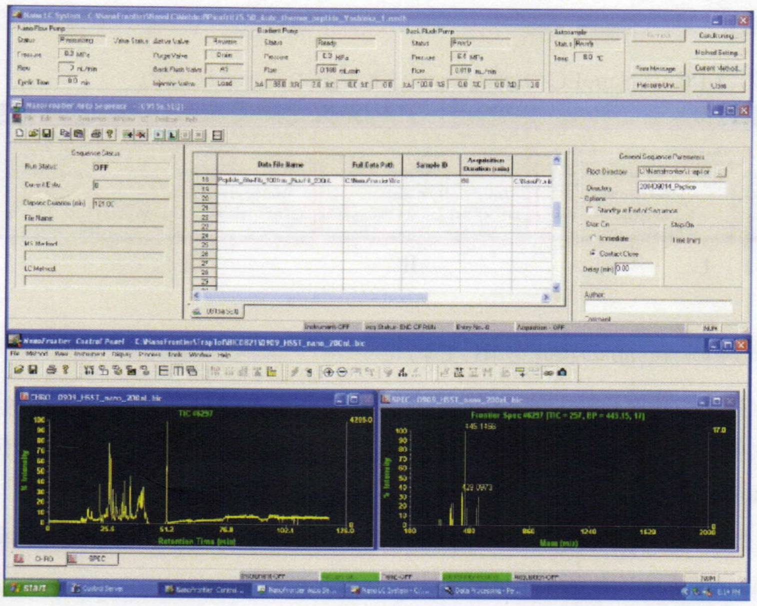
Control Panel ソフトウェアが自動起動

⇩



LC メニューから Connect(1DLC)もしくは 2D Connect(2DLC)を選択
(Nano LC Control Panel が自動起動)

⇩



Nano LC system ウィンドウの表示

1-2 NanoLC 部のセットアップ

① NanoLC 部の状態を確認します。

・各々のラインの溶液が測定終了時まで充分であることを確認します。

（NanoFlowPump、GradientPump、LoadingPump、AutoSampler）

・廃液入れに廃液が入るだけの容量があることを確認します。

・送液を停止していた場合はパージを行います。

NanoFlowPump： PC から操作してパージを行います。少なくても 20 分以上行ってください。

（NanoLC コントロールパネル（下図参照）の Condition－Nano Flow Pump Purge On でパージを開始します ）

再度 Purge Off でパージが終了します。パージが終了した状態では送液は行っていないので送液するには Pump On を押します。

GradientPump、LoadingPump： UI パッド上から操作してパージを行います。

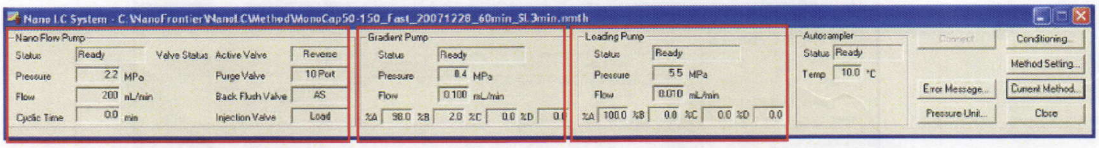
○ パージ開始時 ポンプがオンの状態で UI パッド上の Manual－パージしたい流路（A または B）を選択－パージバルブを開ける－Purge

○ パージ終了時 Purge－パージバルブを閉める－Initial－

（この状態ではポンプは最後に転送した際のメソッド条件で送液を開始します。）

・各ポンプの圧力が安定するのを待ちます。

各々の圧力は PC の NanoLC コントロールパネル上に表示されます。



Ⅰ　　　　　　Ⅱ　　　　　　Ⅲ

Ⅰ Nano Flow Pump の状態を示します。

Status:装置状態 Pressure:圧力 Flow:流量 Cyclic Time:データ収集開始からの時間

Active Valve、Purge 、Back Flush Valve、Injection Valve:各バルブの位置

Ⅱ Gradient Pump の状態を示します。

Status:装置状態 Pressure:圧力 Flow:流量 %A %B %C %D:溶液の混合割合

Ⅲ Loading Pump の状態を示します。

Status:装置状態 Pressure:圧力 Flow:流量 %A %B %C %D:溶液の混合割合

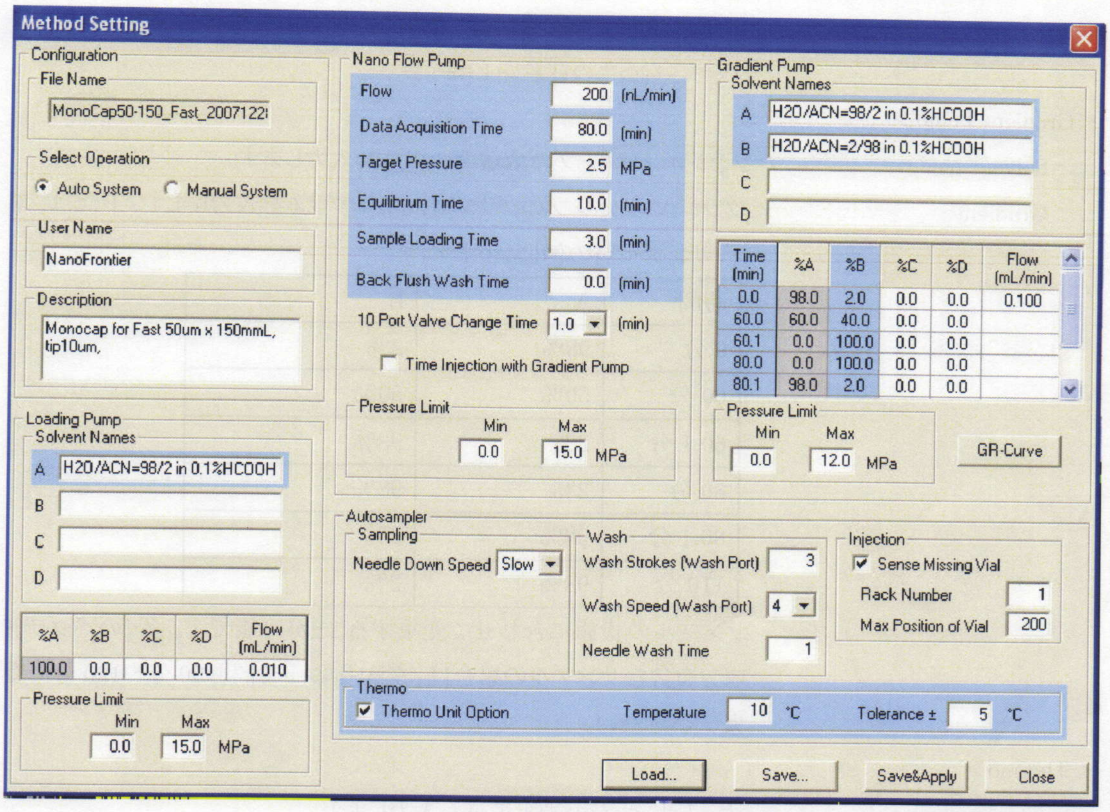
分離カラムによって Nano Flow Pump の圧力が決まり、トラップカラムによって Loading Pump の圧力が決まります。

・液漏れがないこと及び圧力が安定していることを確認します。

・チップの先端に液滴があることで送液を確認します。

② LC のメソッドを作成します。

LC のコントロールパネルから Method Setting を開き、各パラメータを設定します。



サンプルや分離カラムによって変更する部分は水色で表示されています。

＜Loading Pump＞

Solvent names	ローディングポンプの溶液の組成を入力します。 その下段のところでローディング溶液の流量を設定します。

＜Nano Flow Pump＞

Nano Flow Pump Flow	ナノフローポンプの流量を入力します。
Data Acquisition Time	NanoLC のデータ収集(圧力モニタ)時間を入力します。
Target Pressure	ポンプスタート時及びプランジャ切り替え時のナノフローポンプの加圧目標圧力値を入力します。目標圧力は、グラジエントポンプが初期移動相で送液している時の圧力を設定します。
Equilibrium Time	サンプル測定用の平衡化時間を入力します。
Sample Loading Time	オートサンプラでサンプルを吸入し、トラップカラムまでに到達するまでの時間を入力します。サンプルローディングタイムが長すぎますと吸着の弱いサンプルがトラップカラムから抜けてしまいますので注意が必要です。通常 1ul 注入時で 3～4 分の時間で入力します。

Back Flush Time　サンプルロード後に脱塩とサンプル濃縮のためにサンプル注入と逆方向にバックフラッシュ溶液を流します。長い時間バックフラッシュを行いますとカラムへの吸着が弱いサンプルに関してはトラップカラムから抜けやすくなるため注意が必要です。

＜Gradient Pump＞

Solvent names　グラジエントポンプの溶離液の組成を入力します。

Gradient　グラジエントポンプのグラジエントプログラムを入力します。下記は、単一サンプル時の例になります。

時間	A	B
0 分	98%	2%
60 分	50%	50%
60.1 分	2%	98%
80 分	2%	98%
80.1 分	98%	2%
110 分	98%	2%

サンプルの状態に合わせて変更することが可能です。多くのペプチド成分を含むサンプルの場合は、グラジエント時間を 90 分～120 分に変更してください。

＜Thermo＞

Temperature　オートサンプラの設定温度を入力します。

Tolerance　オートサンプラの温度の許容範囲値を入力します。

作成した条件を、Save をクリックして名前をつけて保存し、Save&Apply を押してメソッド情報を装置側に反映させます。

1-3 質量分析計部のセットアップ

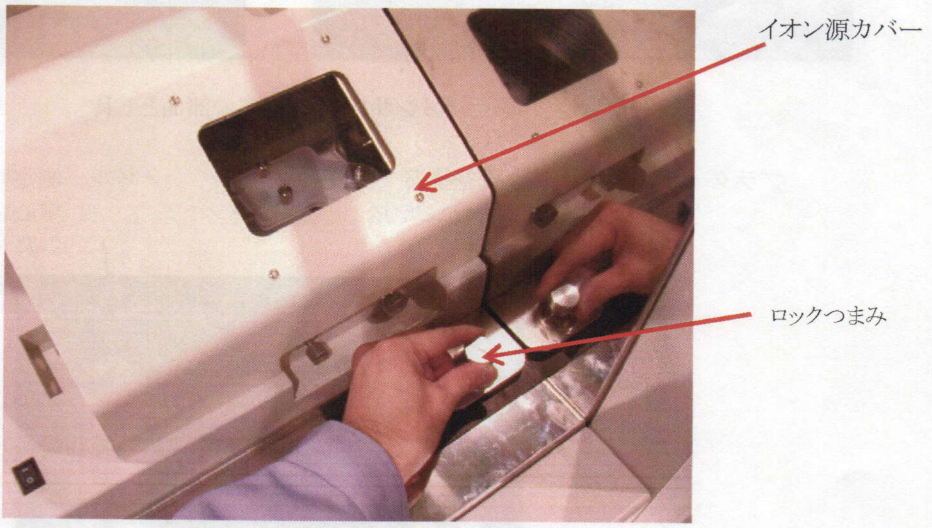
Control Panel ソフトは、真空排気を含む装置のステータス制御です。
TOF、イオントラップを含むキャリブレーション、測定モードの切り替え、パラメータの調整、データ収集などの機能を持っています。

① 装置の起動
Control Panel ソフトの"System Status"の中の"Instrument Status"が"OFF"になっていることを確認します。
なお、NanoFrontier LD の装置状態は、以下の表の通りです。

状態	説明
Shut	真空排気を停止し、NanoFrontier LD が完全に停止している状態です。メニューバーの[Instrument]－[Instrument－Shut]を選択することで、真空排気停止シーケンスが始まり、約10 分後に真空排気が停止します。
OFF	真空排気のみが完了している状態です。イオン源部ヒータは OFF となり、各種電極電圧はすべて印加されていません。測定操作はできません。測定終了時はこの状態にします。
Standby	MS 部分の真空排気が完了していますが、各種電極電圧はすべて切れています。イオン源部ヒータのおよびガスの設定が可能です。測定操作はできません。
ON	MS 部の真空排気が完了し、イオン源ヒータが ON となり、各種電極の電圧が出力可能な状態です。この状態で測定操作を行います。

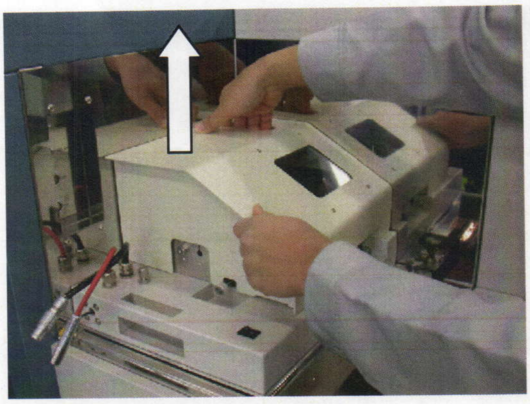
イオン観測を始める前に、下記の操作・確認を順に行ってください。
(1)～(7)の作業は、装置ステータスを Standby にする前に行ってください。

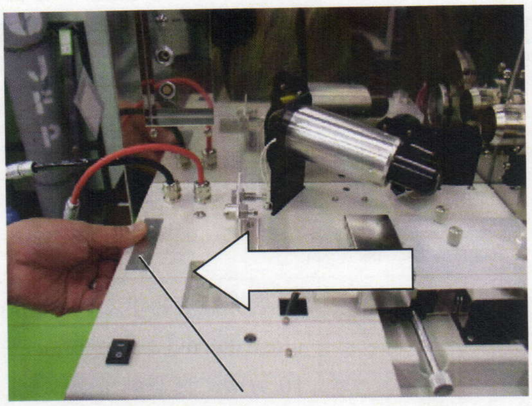
(1) 装置のステータスが OFF になっていることを確認してから、ロックつまみを左（反時計回り）に回し、イオン源のロックを解除します。



イオン源のロック解除

(2) イオン源カバーを上部に持ち上げながら取り外します。
次に、イオン源部を左方向に移動させてください。

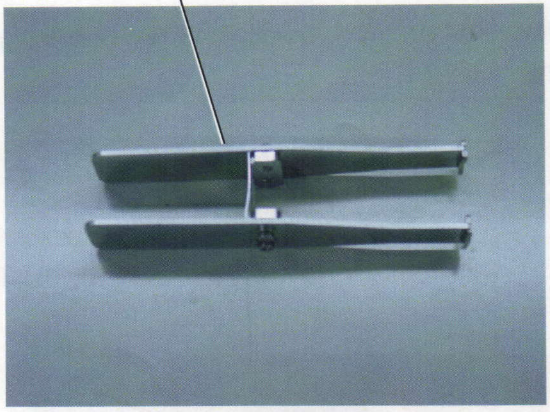




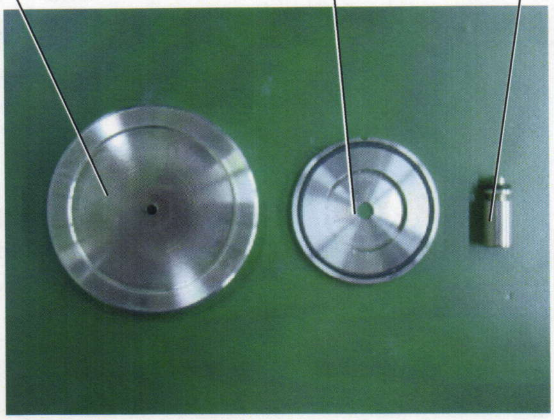
取っ手

イオン源の移動

専用工具（ピンセット）



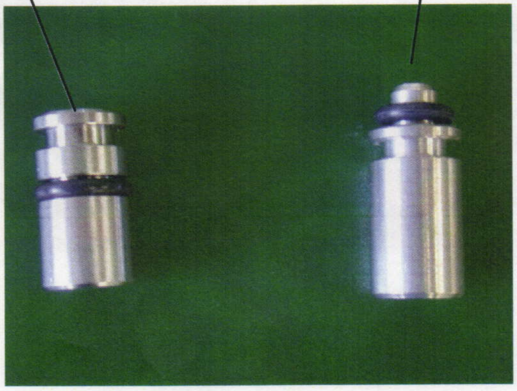
カウンタガスカバー　　カウンタガスプレート　　ノズル



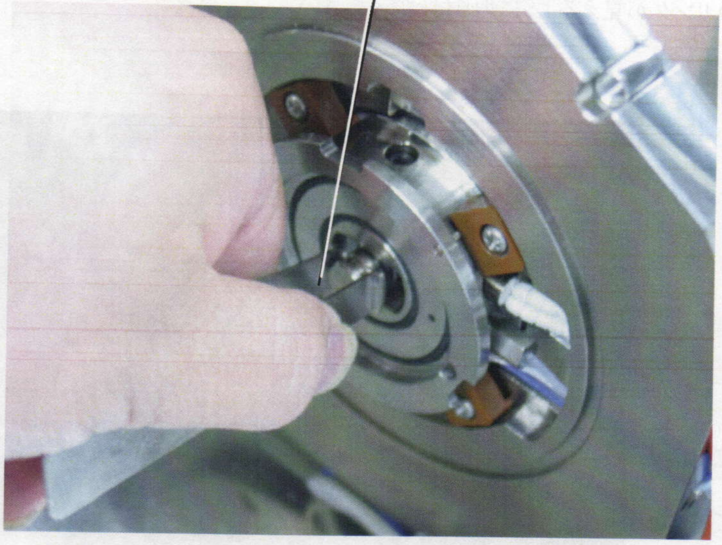
イオンサンプリング部の部品と工具

プラグ：測定しない時、真空排気
部分の栓として装着します。

ノズル：測定時に装着します。
中心にイオンサンプリング
のための穴があります。

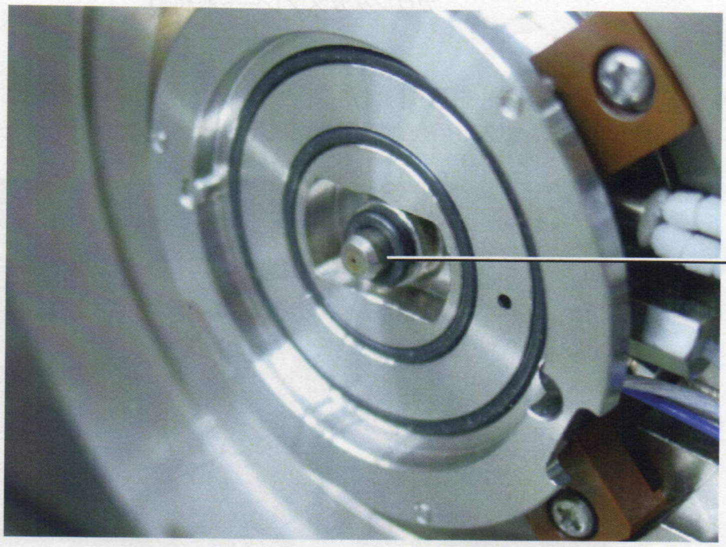


プラグとノズル



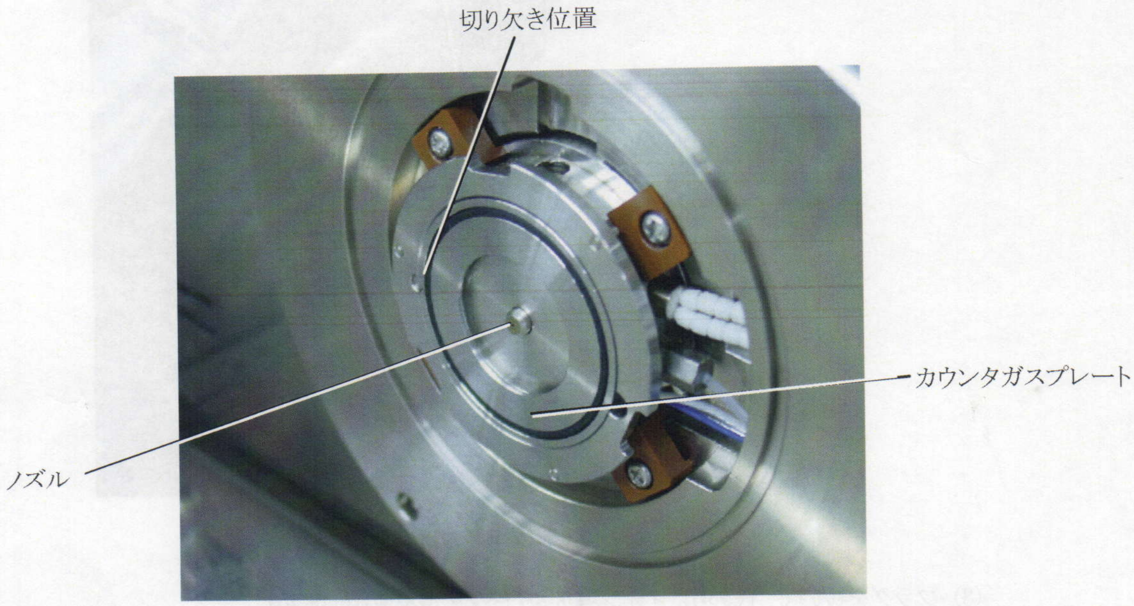
プラグの取外し

(3) プラグを抜いて、代わりにイオン導入を行うノズルを取り付けます。



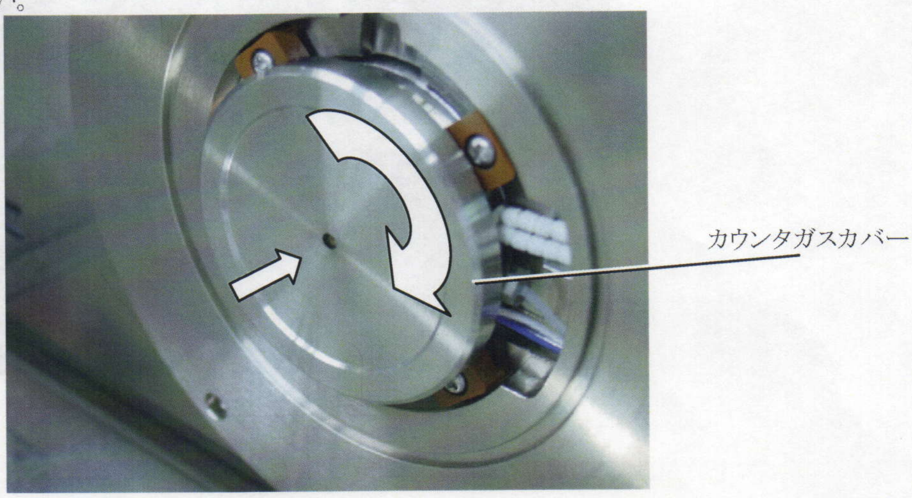
ノズル取付け

(4) ノズルを付けた後、カウンタガスプレートを取り付けてください。
カウンタガスプレートは、切欠きを確認して押し込んでセットしてください。また、カウンタガスプレートはＯリングが見えるように取り付けてください。



カウンタガスプレート取付け

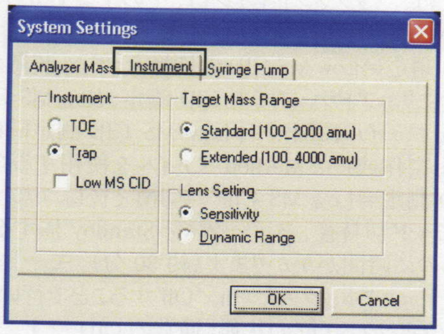
(5) ノズル、カウンタガスプレートを取り付けたら、カウンタガスカバーを取り付けてください。
カウンタガスカバーは、切欠きの位置を注意して、押し込んだ後、時計方向に少し回してしっかりと取り付けてください。



カウンタガスカバー取付け

(6) 窒素ガスの準備を行ってください。ボンベを使用している場合は、元栓を開いて、窒素ガスをいつでも流せるようにしてください。窒素ガス発生装置を使用している場合は、発生装置の電源をオンにしてください。

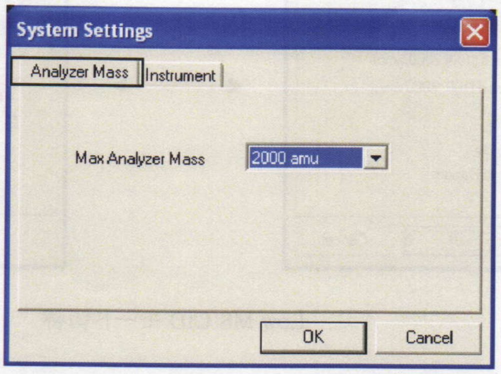
(7) 装置の測定モードを確認してください。
測定モードは、System Status 画面で確認できます。
切り替え操作は、メニューの Instrument System Settings を指定して、表示されるダイアログボックスで、Instrument のタブをクリックすることで表示することができます。
先に開いた各モード用の bic ファイルと、現在のモードが一致していることを確認してください。併せて、TOF の測定質量数のモード：Analyzer Mass の設定も確認してください。



System Settings (Instrument 設定)

ここでは、Instrument：Trap モード、Target Mass Range：Standard に設定してください

注 ：測定モードの切替えは、Instrument Status が OFF のときのみ実行可能です。



System Settings (Analyzer Mass 設定)

ここでは、Max Analyzer Mass は 2000amu に設定します。

＜補足：Low MS CID モード＞

このモードは、MS/MS 動作の中のイオン選択までをリニアトラップで行い、選択したイオンをリニアトラップから送り出して、開裂反応をリニアトラップの後ろに配置されているコリジョンチャンバーで行います。

通常のリニアトラップでの MS/MS 測定との差異と注意点を下記に示します。

■ コリジョンチャンバーにはHeではなく、窒素ガスを導入します。リニアトラップでのCID反応に比べて低質量数側のカットオフがないため、低質量数のフラグメントイオンを観測することができます。

■Low MS CID モードでは、フラグメントイオンは、そのまま TOF に送られて検出されますので MS/MS/MS 測定はできません。MS/MS までの測定が可能です。

■リニアトラップでの CID 測定⇔Low MS CID の切換え時は、装置のステータスを OFF にする必要があります。このため、連続測定中にリニアトラップでの CID 測定、Low MS CID 測定を自動的に切換えることはできません。また MS の Method ファイルに関して、Low MS CID 測定時は、Low MS CID モードで作成し、保存した bic ファイルを Import して作成した Method ファイルを使用する必要があります。

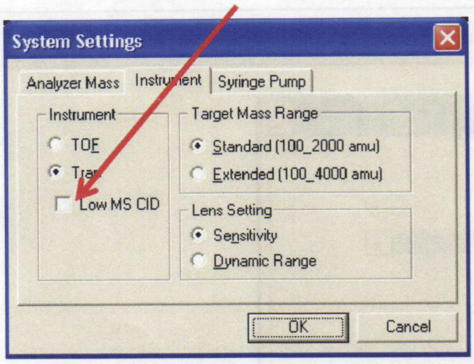
■リニアトラップでの CID 測定⇔Low MS CID の切換え後はコリジョンチャンバーへの導入ガスが He⇔窒素ガスで切り替わります。モード切替後、ステータスを Standby にするとガスが流れ始めますがガス種が完全に切り替わって安定化するのに時間がかかります(約 30 分)。モード切換えは、System Settings ダイアログボックスで、Low MS CID のチェックボックスを On／Off することで行います。

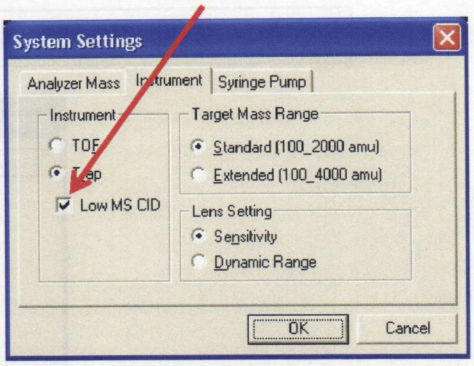
Low MS CID チェックボックス Off の状態:通常の CID です

Low MS CID チェックボックス On の状態:Low MS CID です

チェック無し:リニアトラップの CID

チェック有り:Low MS CID





Low MS CID モード切替

切換え作業は下記の手順で行います。

i 装置ステータスを Off にします。

ii メニューの Instrument System Settings を指定して、System Settings ダイアログボックスを表示させます。

iii ダイアログボックスで、Instrument のタブをクリックします。Low MS CID のチェックボックスを切換えます。
(Low MS CID モードに切換える場合は、チェックをつける)

iv ボタンをクリックしてダイアログを閉じます。

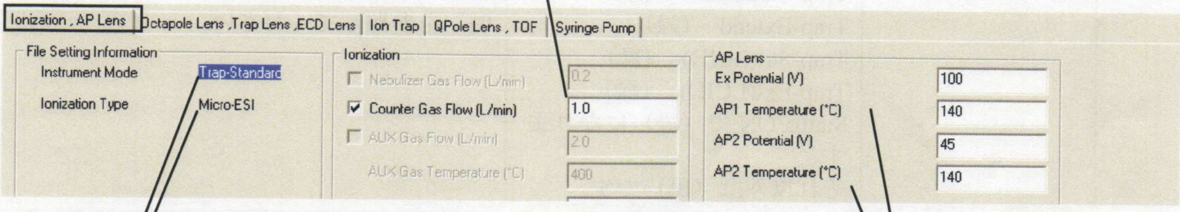
v OK 装置ステータスを Off→Standby にします。この状態でガスが切り替わり、コリジョンチャンバーへ流れ始めます。この状態で、約 30 分間そのままお待ちください。
安定化後、装置ステータスを On にしてイオンを確認します。Low MS CID モード時は、Trap Lens 設定、Q Pole Lens 設定を微調整する必要がある場合があります。通常は据付者が Low MS CID 測定用に調整した bic ファイルを基準に調整して使用してください。

(8) 装置のステータスを Standby にしてください。
装置ステータス Off から Standby への移行は、メニューの Instrument Instrument ー Standby を指定するか、もしくはツールバーのボタン をクリックすることで行えます。 Off から Standby にすることで、自動的に Trap 部、コリジョンチャンバー部への He の導入(TOF モード時はコリジョンチャンバー部のみ)が行われます。
He ガス導入後、ガス量が安定するまで2～3分程度かかります。

(9) イオンのサンプリング部(細孔部:Ap1、Ap2)のヒーターがオンになっていることを確認してください。
オンになっていない場合は、ツールバーのボタン をクリックしてください。温度設定を確認してから、System Status で、温度の読み取り値が、設定値に対して±5度前後で安定していることを確認してください。

(10) 窒素ガスが流れることを確認してください。
室素ガスが流れていない場合は、ツールバーのボタン Gas をクリックすることで On/Off が 可能です。
流量設定を確認してください。実際に流れているガス量は、System Status で確認することができます。

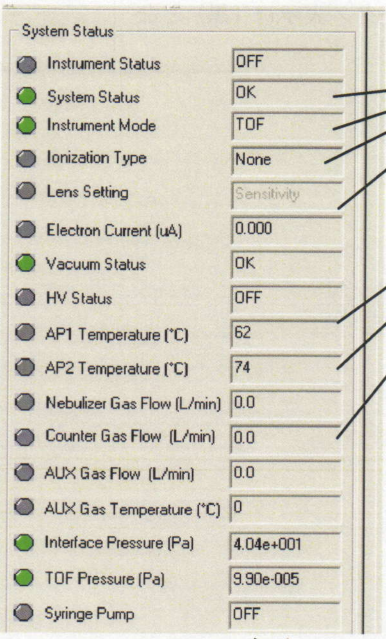
Counter Gas の流量設定を行います。



Ionization, AP Lens 設定

Instrument Setting File
を前回保存/データ収集した際の装置モード、イオン源が表示されます。

AP1、AP2 の温度設定を行います。
通常:130～140℃程度(nanoESI)



現在の装置 Status、装置モード、イオン源が表示されます。

AP1、AP2 の温度、Curtain Gas の流量をモニターします。

System Status 表示

下表に主要なSystem Status表示項目の説明をします。
表内の(黒)(黄)(緑)は表示項目の左側に表示しているランプの色を示しています。

System Status 表示の説明

項　目	ステータス表示(色)	説　明
Instrument Status	Shut　(黒) OFF　(黒) Standby　(黄) ON　(緑)	装置の現在のステータス表示。 各ステータスの詳細については、3.2.1 "各ステータスの説明" を参照してください。
System Status	OK　(緑) Waiting　(黄) Minor Fault　(黄) Major Fault　(黄)	装置の状態表示。 正常 : OK 遷移状態 : Waiting エラー発生状態 : Minor Fault、Major Fault エラーについては、NanoFrontier L/LD 取扱説明書（お客様用保守編）「付録　エラーメッセージ一覧」を参照してください。
Instrument Mode	TOF　(緑) Trap-Standard　(緑) Trap-Extend　(緑) Trap-Std(LCID)　(緑) Trap-Ext(LCID)　(緑) Status ON で（緑）になります。 それ以外は（黒）です。	装置の現在のモード表示。 各モードの説明については、3.2.2 "各モードの説明" を参照してください。
Ionization Type	Micro-ESI　(緑) Nano-ESI　(緑) Semi-Micro　IS(緑) 取り付けられていないときに ステータス表示は（黒）となります。	現在装着しているイオン源を表示します。

② イオン確認

装置のステータスをStandbyからOnにしてください。

StandbyからOnへの移行は、メニューの Instrument | Instrument－On を指定するか、もしくはツールバーのボタン をクリックすることで行えます。

ステータスがOnになると、イオン源、分析部、検出器など各部の電圧がオンになり、イオンを観測できる状態になります。

＜イオン源の調整＞

nanoESIイオン源の調整を行ってください。

イオン源－サンプリング部の試料のイオン化に関する重要な調整項目としては、以下の項目があります。

①キャピラリ(プローブ)とノズル(AP1)の位置

②Spray Potential 電圧

③Counter Gas 流量

キャピラリ(プローブ)の位置に関しては、イオン源に付属のX-Yステージの位置調節により、キャピラリとノズル(AP1)の位置関係を調整します。

イオン強度が最大になるように、位置調整を行ってください。

②、③は、プローブとノズルの位置関係や使用している溶媒、イオン源の汚れ、温度などにより最適値は微妙に変化します。

nanoESI イオン源

○ チップ先端位置を確認する

・チップの先端は、カーテンガスカバーとノズルの間に入るように、チップとノズル細孔は正対するように位置調整する(下図参照)。

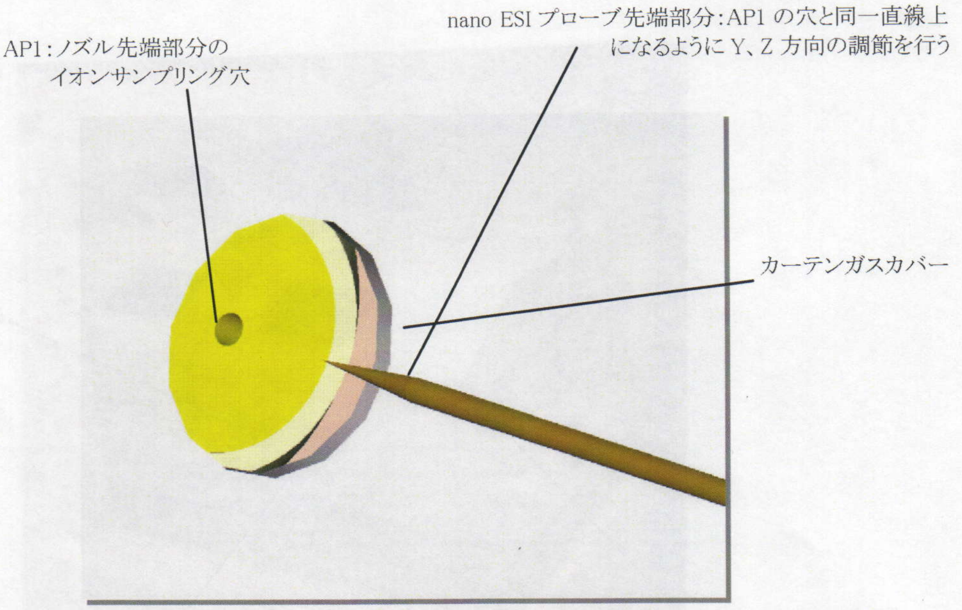
○ 液晶モニタからチップ先端を確認する

・MS Status ON の状態(電圧印加している状態)でイオン化が安定していれば液滴・飛沫などは何も見えない(スプレーも見えない)。

・液滴・飛沫が生じている場合は、Instrument Setting Window の Spray Potential を一旦高く(または低く)設定して液滴を飛ばした後、使用する電圧に戻す。または Curtain Gas Flow を一旦高く設定した後、使用する流量に戻す。

(例えば液滴が生じている場合、通常 1400V であれば一度 1600～1800V に上げて液滴が無くなったら 1400V に戻す。

○ TIC が安定しているかを確認する



モニタ画面(モデル図)

③ bic ファイルの確認

装置を制御するパラメータ値は、Instrument Setting File(*.bic)として保存、読み込み編集が可能です。
装置条件は、使用するアプリケーション(測定試料の種類、溶媒の種類、流量その他)や装置の状態(イオン源の汚れ具合など)によって微調整が必要ですが、測定モードや観測するイオンの極性などによっても変更が必要になります。

Trap モード選択時のパラメータ値の目安(nanoESI 使用時:正イオン化 参考値)

Counter Gas Flow	0.5～1.0	Skimmer Potential	10～12
Spray Potential	1400～1800	Qpole RF voltage	1000～1200
Ex Potential	100～110	Qpole Offset Potential	5～9
AUX Gas Temperatuer	----	Deflection Potential	−1.0～1.0
AP1 Temperature	140	Einzel Potential	−10～−50
AP2 Potential	45～55	Front Vane Potential	7～11
AP2 Temperature	140	Rear Vane Potential	6～10
Octa RF Voltage	150	Push Pulse Potential	550～600
Inter Octa Offset	35～45	Pull Pulse Potential	300～350
Slit Potential	15～25	Pull Bias Potential	−50～50
Trap Octa Offset	20～35	Accel Potential	4000
Trap Offset Potential	16	Reflector Potential	1050
Endcap Potential	60	Detector Potential	2000～2100
Micro Sequence	51	Ion Count Threshold	0
Accumulation Time	20	First Mass	100.00
Accumulation FNF Gain	0	Last Mass	2000.00
Accumulation Mass	2000_2000		

上記の値は目安です。例えば Spray Potential は ESI キャピラリ先端とノズル(AP1)との位置関係や、先端部の汚れなどによっても最適値が変化します。このように他のパラメータとの関連や装置の状態によって調整が必要なパラメータがありますので、その都度調整を行ってください。

また TOF 部分のパラメータについては装置によって機差があります。通常は据付け時に調整された設定値でご使用ください。

注 ：*.bic ファイルには、通常画面に表示されている装置条件の設定値に加えて、TOF のキャリブレーションも保存されます。このため、異なる*.bic ファイルを開いた場合、質量数がずれることがありますので注意してください。
Trap のキャリブレーションについては、*.bic ファイルごとではなく、各モードごとに 1 個ずつ持っていますので、ファイル変更の度に確認－補正の必要はありません。

1-4 測定条件(Method)のセットアップ

Methodファイルの作成をはじめる前に、各Segmentで使用するInstrument Settingファイル(*.bic)を作成してください。

ファイルに必要な制御条件をすべて登録して、別名称で保存しておきます。

この際、注意点としては、一つのMethodファイルに登録する条件は、下記の条件を満たしていることが必要になります。

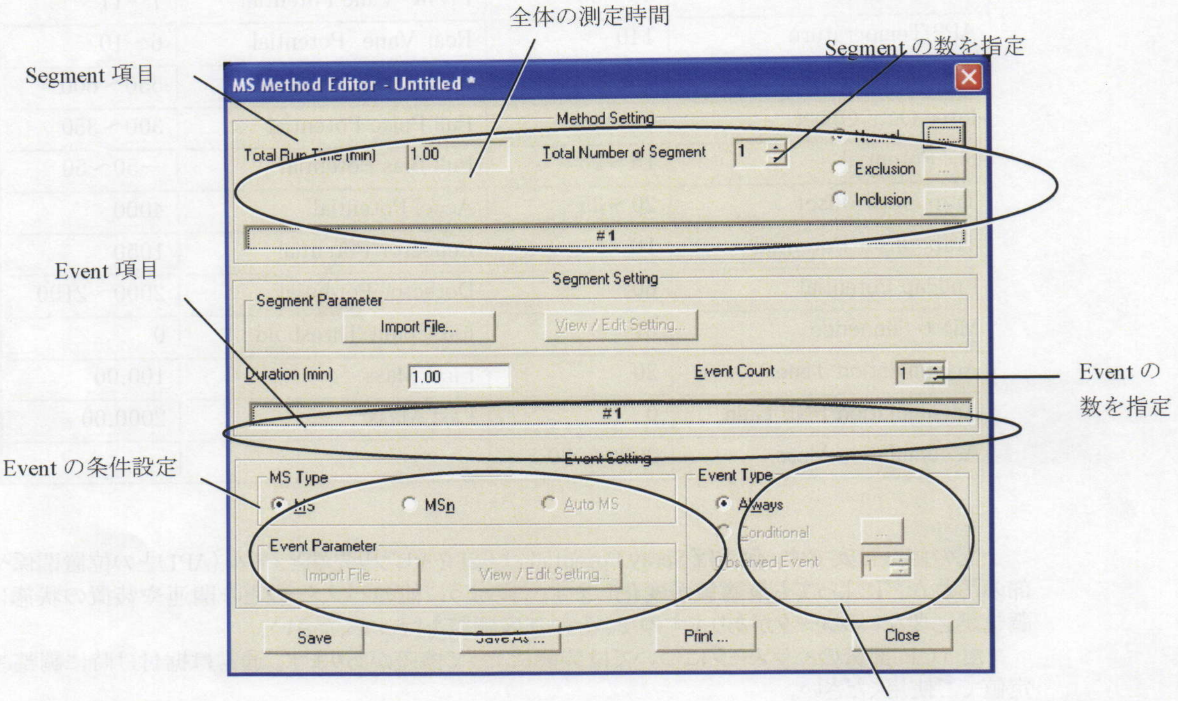
(1) 同じ制御モードであること(Trapモード(Standardモード、Extendedモード)、TOFモードで設定したInstrument Settingファイルであること)。

(2) 同じイオン源で設定したInstrument Settingファイルしか指定できません。

Methodファイルの新規作成

Methodファイルを新規作成します。メニューの Method New MS Method... を指定してください。

下図のMS Method Editorダイアログボックスが表示されます。



Methodダイアログ

＜Auto MS 測定の設定方法＞

ここでは、Auto MS 測定を行う場合の操作について説明します。

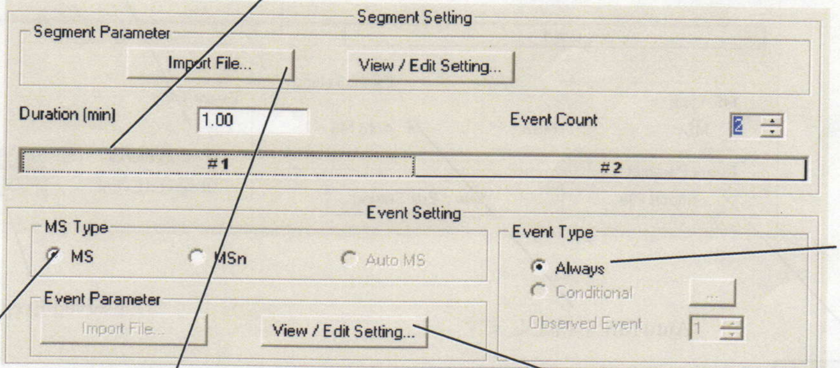
Auto MS 測定は下記の特徴があります。

- MS／MS 測定の基本的な条件だけを設定しておき、Target イオンの質量数は、MS 測定の結果からソフトが自動的に決定して MS／MS 測定を行います。
  このため、必ず最初の Event を MS 測定にして、この結果をリファレンスデータにします。
- MS／MS 測定を実行するかどうかは、リファレンスとなる MS データに、登録してある制限条件に該当するピークが検出されたかどうかによって判定されます。
  条件が満たされない場合は、MS／MS 測定は行われず、MS 測定のみが繰り返されます。
  条件が満たされた場合は、予め登録してあるルールに従って Target イオンを決定し、自動的に MS／MS 測定が行われます。MS／MS 測定を完了すると、また最初の Event に登録してある MS 測定を行います。
- Auto MS モードでは、MS^3 までの測定が可能です。但し、Instrument Mode が Low MS CID Mode の場合は MS／MS までとなります。
- MS／MS の Target イオンは指定条件によって決定されます。

MS＋MS／MS 2Event の例

- リファレンスデータの Event1： MS
- Event1 を参照する Event2：Auto MS

Event 1 を指定します



Always 指定を確認します

MS を指定します

[Import File ...] をクリックして Instrument Setting ファイルを指定します

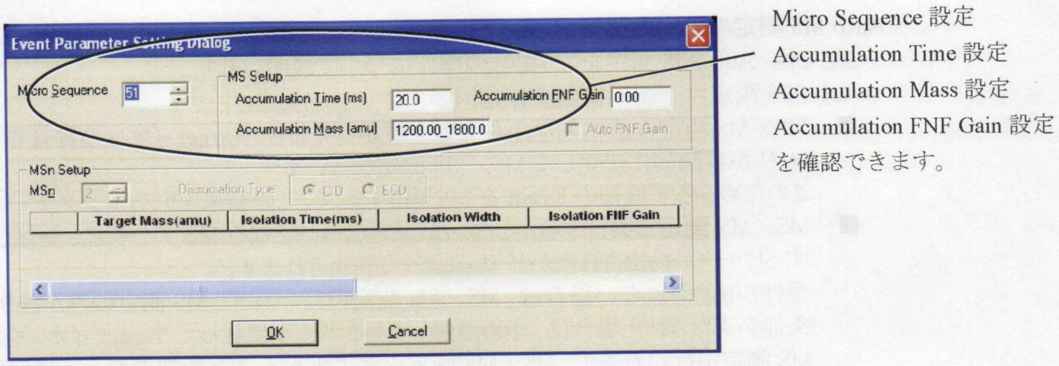
MS Type が MS の場合はクリックすると、下図のダイアログが表示されます。

Accumulation Time や Micro Sequence 設定を確認します。

Event1 の設定

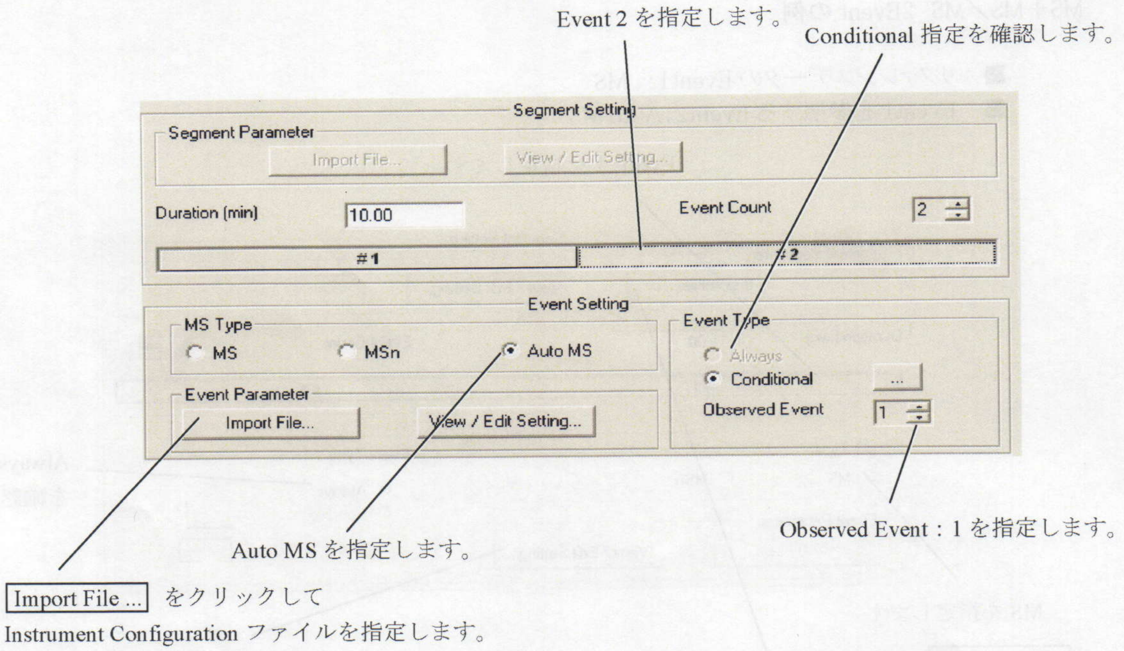
① Event を 2 個作成します。最初の Event1 をクリックして指定してください。

② MS Type を MS に設定して、[Import File ...] をクリックし、Instrument Setting ファイルを指定してください。



MS 条件の確認

③ Event 1 の設定を完了したら、Event 2 をクリックして指定してください。



Event2 の設定

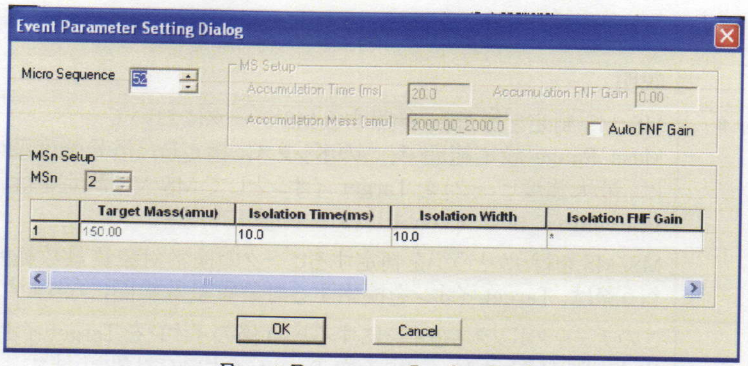
④ Event Parameter の Import File ... をクリックし、Instrument Setting ファイルを指定してください。基本的には Event1 と同じファイルを指定してください。

⑤ Event 2 の MS Type は Auto MS を指定してください。

⑥ Event Type が Conditional であることを確認して、Observed Event にはリファレンスデータとする Event 番号を指定してください。この例では 1 に設定してください。

⑦ View／Edit Settings... ボタンをクリックして、MS／MS の基本的な条件を確認編集してください。

⑧ Event2 の MS Type を MS から AutoMS に変更し、Event Parameter の中の View/Edit Setting... ボタンを押します。Event Parameter Setting Dialog ウィンドウが開くので MSn Setup 設定項目を参考に値を入力し、OK をクリックします。



Event Parameter Setting Dialog

MSn Setup 設定項目

項目	説明
Target Mass	MS/MS の Target イオンの質量数を設定します。AutoMS 測定時は自動で Target イオンを選択しますのでここでは選択できません。
Isolation Time	Target イオン選択の時間を設定します。通常 5(ms)程度で使用します。
Isolation Width	Target イオンの選択幅を設定します。通常 10(m/z)で使用します。
Isolation FNF Gain	Target イオン選択に使用する FNF 電圧を設定します。AutoMS での測定時は*(アスタリスク)を入力し、Target Mass の値に応じて、自動的に電圧を変更します。
CID Time	CID 反応の時間を設定します。通常 5～10(ms)を入力します。
CID FNF Gain	CID の FNF 電圧を設定します。IBA での測定時は*(アスタリスク)を入力し、Target Mass の値に応じて、自動的に電圧を変更します。
CID CutOff Level	Target Mass に対してプロダクトイオンを観測できる質量数の下限が変わります。低い値ほど下限が下がります。通常3でお使いください。
CID FNF Gain %	ここに数値を設定すると、CID 時間中に CID 電圧を変えながら測定を行います。入力範囲 0－50%です。通常は 0 設定で測定を行い、CID 反応が不十分な時などに適宜使用ください。

⑨ 再度 Event2 を選択し、Event Type に Conditional が選択されていることを確認し、Event Type の Conditional の右側にある、[...] ボタンをクリックしてください。設定ダイアログボックスが表示されます。

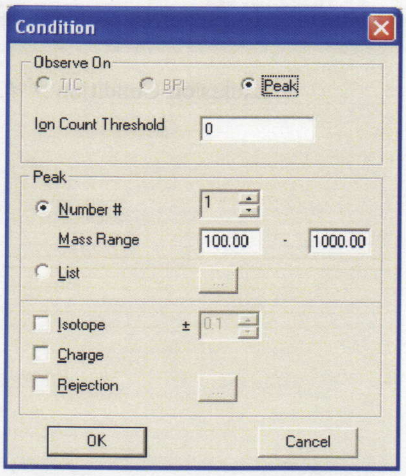


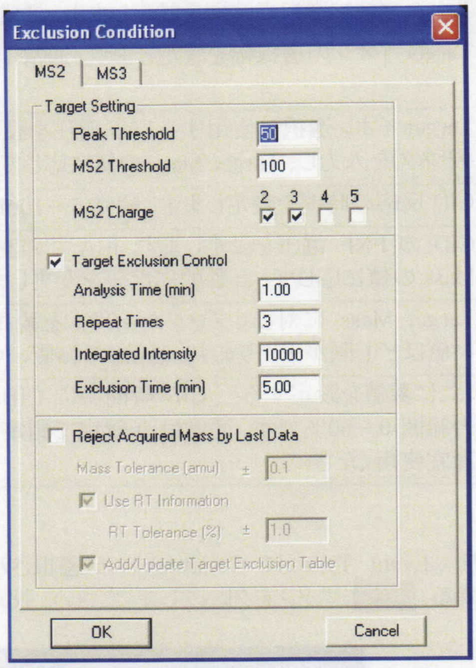
図 Condition ダイアログ

Condition ウィンドウの設定項目

項目	説明
Peak Number #	MS/MS 測定を行う際、参照する MS データにおいて、Mass Range 設定範囲で、このボックスに指定した信号強度順のピーク(1と設定した場合は、最大強度ピーク)を Target イオンとして MS/MS 測定を行います。通常、Event2 には 1、Event3 には 2、Event4 には 3...と設定します。
Mass range	MS/MS を行うかどうかを判定するピークの検索対象質量数範囲を指定します。MS/MS を行う際は、Target イオンを検索する対象質量数範囲になります。
Charge	このチェックボックスをオンにすると、1価のイオンを Target イオンの候補から除外して2価以上と判定されたピークのみを Target イオンの対象とします。

⑩ Method Setting を Exclusion に設定してください。

MS/MS を実行するかどうかのしきい値、Target イオンの決定方法のルールは、別画面で設定します。Method Setting の Exclusion の右側にある、... ボタンをクリックしてください。Exclusion の設定ダイアログが表示されます。



Exclusion Condition ダイアログ

項　目	説　明
MS2 タブ	
Peak Threshold	ピークとして認識させるしきい値を設定します。 このしきい値を超える強度の信号を Exclusion モードではピークとして認識します。 通常は 30～100 を設定してください。 バックグラウンドが高い状態で小さな値を設定しますと、性能が低下する可能性があります。 入力範囲:1～10000
MS2 Threshold	MS／MS 測定を行うかどうかのしきい値を設定します。 このしきい値を超える強度のピークが MS データに観測され、かつ他の条件を満たした場合、MS／MS 測定を行います。 入力範囲:1～10000
MS2 Charge	MS／MS 測定の Target イオンとする価数を設定します。ここで設定された価数のピークが MS データに観測された場合に MS／MS 測定を行います。 設定可能価数:2、3、4、5

Target Exclusion Control	Target の選択制限を行うか選択します。 On の場合、下記 4 項目による選択制限を行います。 Off の場合、優先価数を考慮した順位で Target を選択します。
Analysis Time (min)	分析時間による制限を行うための時間を設定します。 通常は LC で分離されたピーク幅に合わせて設定してください。 始点は MS データにピークが観測された時点になります。 この値をピーク幅よりも小さく設定しますと、十分な MS／MS データが得られない可能性があります。 入力範囲:0.01～10.00
Repeat Times	選択回数による制限を行うためのしきい値を設定します。 この値は、上記 Analysis Time (min) 内で有効となります。 通常は 2～5 を設定してください。 この値を必要以上に大きく設定しますと、同時に観測された他の Target イオンを選択できなくなる可能性があります。また、必要以上に小さな値を設定しますと、十分な MS／MS データが得られない可能性があります。 入力範囲:1～150
Integrated Intensity	積算強度による制限を行うためのしきい値を設定します。 通常は 10000～100000 を設定してください。 この値を必要以上に大きく設定しますと、同時に観測された他の Target イオンを選択できなくなる可能性があります。また、必要以上に小さな値を設定しますと、十分な MS／MS データが得られない可能性があります。 入力範囲:1～100000

Exclusion Time(min)	継続して出現するピークを選択制限する時間を設定します。 通常は3.00～5.00を設定してください。 始点はAnalysis Time(min)と同様にMSデータにピークが観測された時点になります。そのため、Analysis Time(min)以上の値を設定してください。 Exclusion Time(min)を超えて観測された同一質量・同一価数のピークは別ピークとして認識されます。 この値を必要以上に小さく設定しますと、継続して出現しているピークを別ピークとして認識し、再度Targetイオンとして選択する可能性があります。 入力範囲:0.01～30.00

⑪ Save As...を選択し、Methodファイルの保存を行います。

<Targetイオンの選択履歴を使用した設定例>

この例では、同一試料を連続して2回測定する際に、2回目の測定は1回目にTargetイオンとして選択したピークを回避する設定になります。

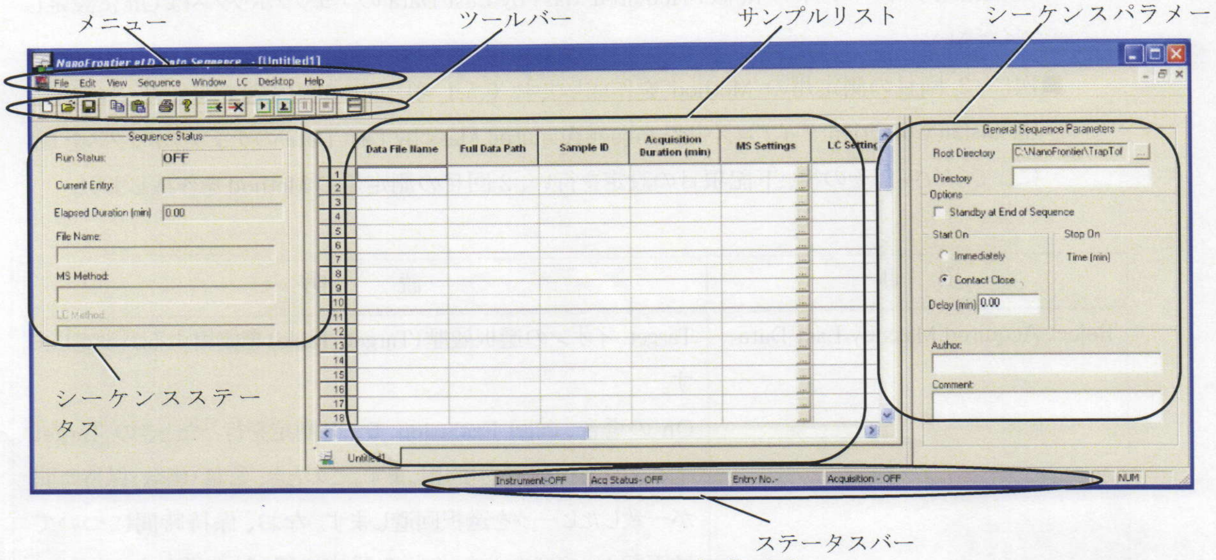
■1回目の測定用のMethodを作成します。先の説明をご参照ください。このとき、Exclusion Conditionダイアログ中のReject Acquired Mass by Last DataのチェックボックスはOffに設定してください。

■次に、2回目の測定用のMethodを作成します。6.5.1項と同じ手順で設定します。このとき、Exclusion Conditionダイアログ中のReject Acquired Mass by Last DataのチェックボックスをOnにしてください。その後、下記項目の設定を行い、2回目の測定用のMethodを作成します。

項　目	説　明
Reject Acquired Mass by Last Data	Targetイオンの選択履歴(Target Table)を使用するか設定します。 Onの場合、前回Exclusionモード測定を行ったときのTargetイオンの選択履歴を使用します。このとき、質量・価数・保持時間が一致したピークを選択回避します。なお、保持時間については下記Use RT Informationの設定に基づき動作します。 Offの場合、Exclusionモードの他の設定に基づきTargetイオンを選択します。なお、選択履歴はOffに設定し、測定を開始した時点でクリアされます。
Mass Tolerance(amu)	m／zの一致裕度を設定します。 通常は0.1～0.5を設定してください。 入力範囲:0.1～10.0
Use RT Information	選択履歴(Target Table)による選択制限を行う条件に保持時間を用いるか設定します。 Onの場合、質量・価数・保持時間が一致したピークを選択回避します。 Offの場合、質量・価数が一致したピークを選択回避します。
RT Tolerance(%)	保持時間の一致裕度を設定します。 通常は1.0～3.0を設定してください。 入力範囲:0.5～10.0
Add／Update Target Table	選択履歴(Target Table)へ新たに選択したTargetイオン情報の追加登録を行うか設定します。 Onの場合、追加登録を行います。 Offの場合、追加登録を行いません。

1-5 AutoSequence 部のセットアップ

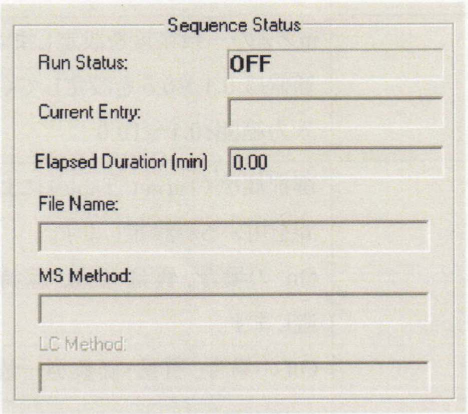
Auto Sequence は NanoFrontier LD の Nano LC と MS を連動し、データを取得するソフトウェアです。1 次元の Nano LC もしくは 2 次元の Nano LC(オプション)どちらも制御可能です。また MS 単体で複数試料を測定することもできます。測定データのファイル名、測定データの保存ディレクトリ、Nano LC の分析条件、MS の測定条件、Autosampler のインジェクション量等を設定します。



Auto Sequence ソフト起動画面

<シーケンスステータス>

シーケンスステータスは、現在測定中のシーケンス情報を表示します。



シーケンスステータス

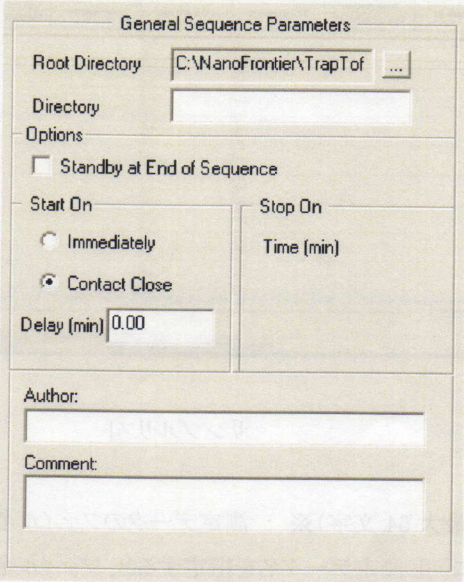
Run Status : 現在のシーケンス状態を示します。

- Off : シーケンス未稼働
- Acquiring : シーケンス測定中
- Waiting : Nano LC もしくは MS の Ready 待ち
- Fault : Nano LC もしくは MS の error 発生
- Paused : 分析シーケンス一時停止

Current Entry（1～100）：現在の測定順番を示します。
Elapsed Duration（0～180 min）：測定の経過時間を表示します。
File Name（最大 64 文字）：現在測定中のデータファイル名を表示します。
MS Method（最大 128 文字）：現在測定中の MS の測定条件ファイル名を表示します。
LC Method（最大 128 文字）：現在測定中の Nano LC の測定条件ファイル名を表示します。

＜シーケンスパラメータ＞

シーケンスパラメータはデータを保存するディレクトリ、シーケンス終了時の MS の装置状態設定、シーケンススタート条件の設定、測定者、コメントを設定します。



シーケンスパラメータ

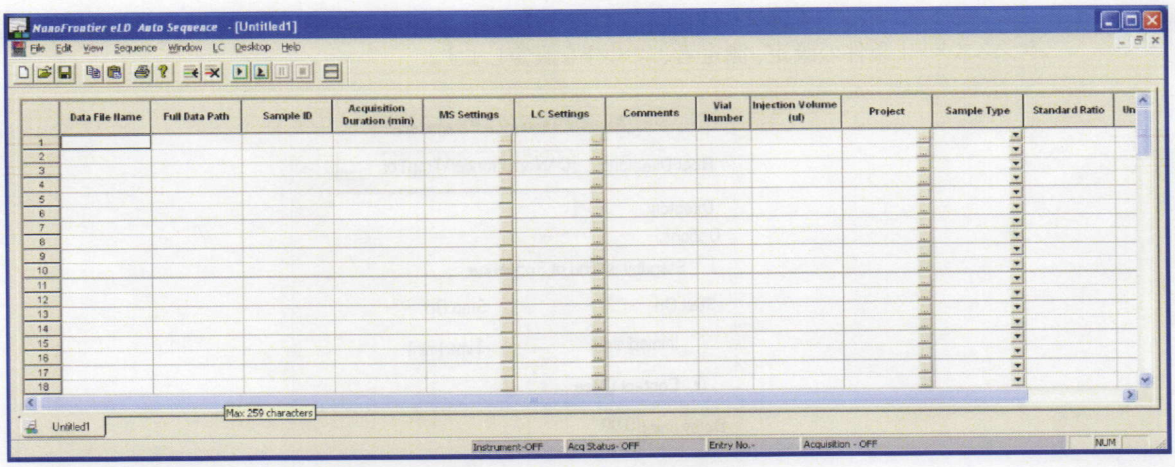
Root Directory（最大 256 文字）：測定データを保存する親ディレクトリを指定します。
Directory（最大 128 文字）：測定データを保存するディレクトリを指定します。
Options：分析シーケンス終了時に MS の装置モードを Standby とする、もしくは On のままとする、の選択を行います。このチェックボックスをチェックすることで、分析シーケンス終了時に MS の装置モードが Standby になります。また、Nano LC システムは Standby 送液になります。

MS（装置モード）	Nano Flow Pump	Gradient Pump	Loading Pump
Standby	50（nL／min）	0.01（mL／min） A：B＝50：50	0.01（mL／min）A100%

Start On：分析シーケンスのスタート条件を設定します。Immediately はシーケンス開始すぐに測定開始します。Contact Close は Nano LC がグラジエント開始となったときに測定開始します。両条件ともに測定開始の遅延時間の設定ができます。遅延時間の設定範囲は 0.0～10.0 分／0.1 分刻みです。
Author（最大 128 文字）：コメントとして測定者名を入力します。
Comment（最大 256 文字）：コメントを入力します。

<サンプルリスト>

サンプルリストはデータのファイル名、サンプル ID、MS の測定条件ファイルの指定、Nano LC の測定条件ファイルの指定等を行います。下記項目の※印は必須項目となります。



サンプルリスト

Data File Name（最大 64 文字）※ ： 測定データのファイル名を設定します。

同じディレクトリ内に同じ測定データ名を指定すると、ファイル名の後に 001 等の 3 桁の連番を自動的に追加します。

Full Data Path（最大 384 文字）：測定時に測定データのディレクトリとファイル名が表示されます。

Sample ID（最大 128 文字）※： 測定試料の試料名を設定します。

Acquisition Duration（0.1～180.0／0.1 刻み）※ ： MS の測定時間を設定します。

ここで指定した測定時間は MS Settings に.bic ファイルを指定した場合（MS 単体での測定）の測定時間となります。.msm ファイルを指定した場合（Nano LC を接続しての測定）は、.msm ファイルで設定した測定時間となります。

MS Settings（最大 128 文字）※ ： MS の測定条件を設定します。Control Panel ソフトで Method ファイルを作成し、そのファイルを指定します。

LC Settings（最大 128 文字）※ ： Nano LC の測定条件を設定します。Nano LC Control Panel ソフトで Method ファイルを作成し、そのファイルを指定します。

Comment（最大 256 文字） ： 測定試料に対してコメントを入力します。

Vial Number（1～384／1 刻み）※ ： オートサンプラが接続されている場合、測定したい試料の入っているバイアルの番号を指定します。

Injection Volume（0～99.9 μL／0.1 刻み）※ ： オートサンプラが接続されている場合、測定試料の注入量を指定します。0 を指定した場合、試料の注入を行わず測定を行います。

以下の項目については、一般的な低分子を対象とした場合の絶対定量分析を行う際に設定を行う項目となります。プロテオーム解析などの NanoLC との接続時には通常は使用しません。

Sample Type (3 種類)：Blank、Standard および Unknown の 3 種類が選択できます。測定試料に合わせて適宜設定します。

Standard Ratio (0.00001～100000.00000)：標準試料を希釈して調整している場合、もっとも濃度の高い標準試料を 1 として、希釈倍率分の 1 を入力します。例えば 5 倍、10 倍、50 倍希釈の標準資料を作成した場合は、それぞれ 0.2、0.1、0.02 と入力します。

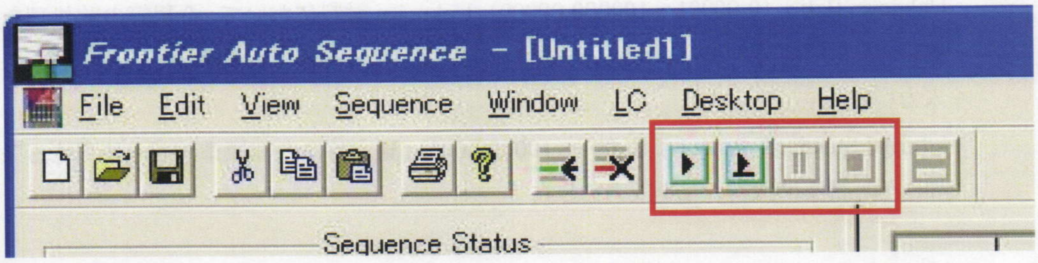
Unknown Ratio (0.00001～100000.00000)：Unknown 試料において、希釈等の前処理を行った場合、希釈倍率分の 1 の値を入力します。例えば、10 倍希釈で試料調整を行った場合は 0.1 を入力します。

Internal Standard Amount (0.001～100000.000)：測定時に内部標準試料を使用する場合、添加した内部標準試料の量を入力します。

1-6 測定

使用するシーケンスを表示させた状態で[Start Sequence]-Full Sequence ボタン もしくは[Start Sequence]-Partial Sequence ボタン をクリックし、測定シーケンスを開始します。

[Start Sequence]-Full Sequence ボタンはサンプルリスト内に設定されたシーケンスをすべて実行し、[Start Sequence]-Partial Sequence ボタンはサンプルリスト内のカーソル位置に設定されているシーケンスを実行します。全シーケンスを終了すると Auto sequence は停止します。



測定シーケンス操作ボタン

- [Start Sequence]-Full Sequence ： サンプルリスト内に設定されたシーケンスをすべて実行します。
- [Start Sequence]-Partial Sequence ： サンプルリスト内のカーソル位置に設定されているシーケンスを実行します。
- [Pause Sequence] ： サンプルリスト中、現在実行中のシーケンスを測定終了後、シーケンスを一時停止します。一時停止の間は、次シーケンス以降のサンプルリスト変更が可能です。
- [Stop Sequence] ： 測定シーケンスを停止させます。Stop Sequence は選択後、すぐに実行されるため、測定試料が NanoLC 内に残る場合があります。その場合は次測定を実行し、NanoLC 内の試料を排出してから、測定を行います。

2 データ処理

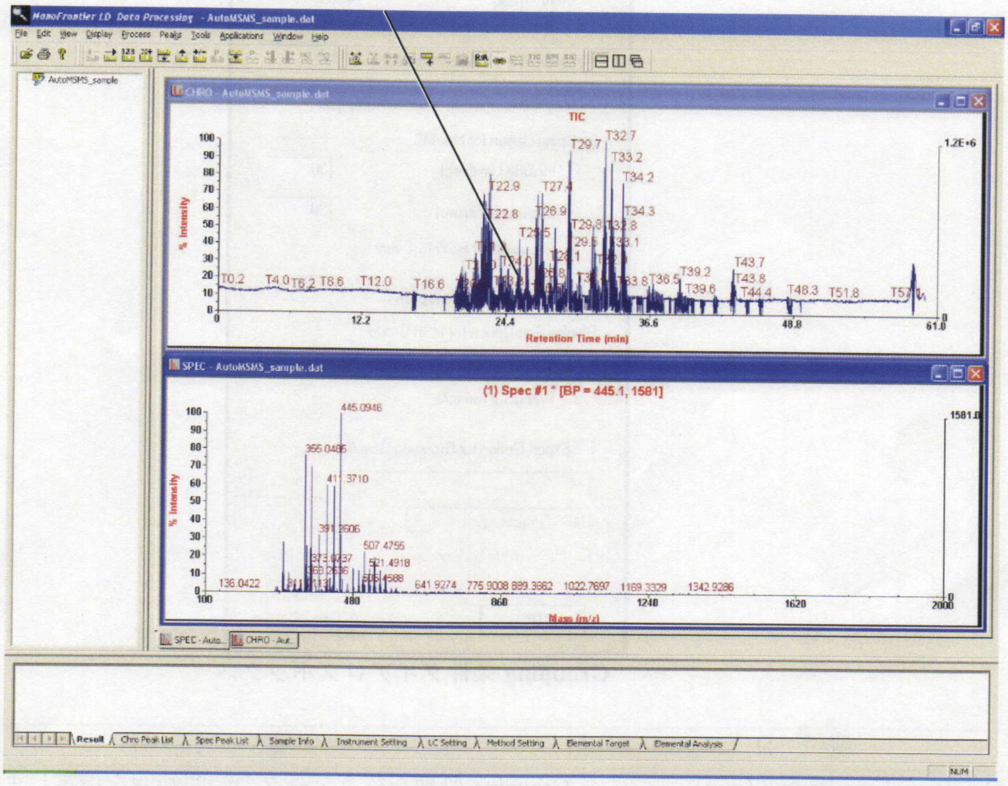
NanoFrontier eLD での Method 測定を行なったデータを用いてスペクトル・クロマトグラムの確認及びMASCOT によるタンパク質同定を行なう場合の mgf（Mascot Generic Format File）への変換方法について説明します。

2-1 Grouping 機能

Auto MS 測定のデータは、Target イオン判定のための MS データと MS／MS データが混在しておりしかも MS／MS データの内容も、Target イオンの質量数が次々に変わっていく可能性があるため多数の異なる条件の MS／MS データを含んでおり、非常に複雑です。

このデータを Target イオンの質量数が切り替わるごとにグループ分けしてリスト表示することでデータ処理を容易にするのが Grouping 機能です。

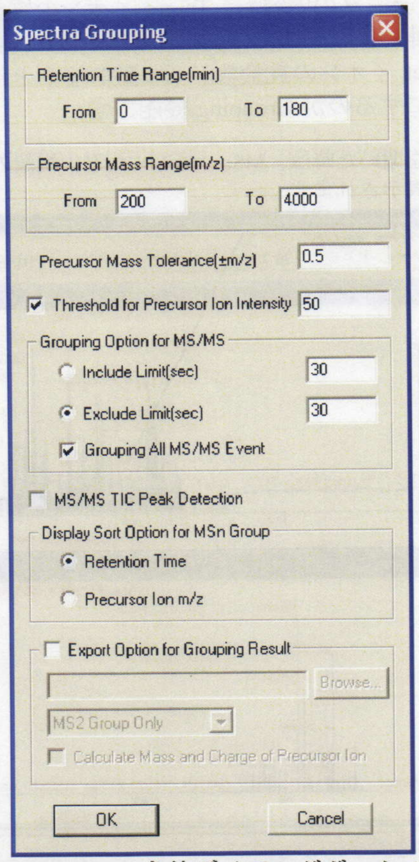
データを開いた時は、MS、MS/MS など、複数の Event 測定すべてを含んだデータが表示されます。



Auto MS データ例

(1) Auto MS の測定結果を表示させると、表示された TIC は MS データと MS／MS データを含んでいます。Grouping 処理を行う場合は、データを開いた後でメニューの File Spectra Grouping ... を選択してください。

(2) Grouping のための条件設定ダイアログボックスが表示されます。



Grouping 条件ダイアログボックス

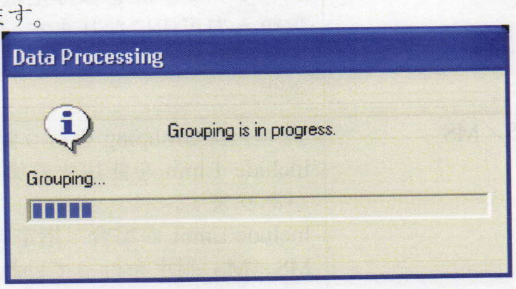
項　　目	説　　明
Retention Time Range（min）	Grouping 処理を行うデータの時間範囲を指定します。
Precursor Mass Range（m／z）	MS／MS データについて Grouping に使用する Target イオンの質量数範囲を指定します。
Precursor Mass Tolerance	同じ Target イオンであると判断して同じ Group のデータとみなすかどうかのしきい値です。 入力範囲：0～10

項　　目	説　　　明
Threshold for Precursor Ion Intensity	Target イオン強度についてのしきい値。 チェックマークをつけた状態にすると、右側の設定ボックスに数値入力可能になります。値を設定すると設定値以上の Target イオン強度がないデータに関しては、Grouping 対象外と判断します。
Grouping option for MS／MS	データの Grouping を行う際のルール設定。 Include Limit を使用する場合と Exclude Limit を使用する場合があります。 Include Limit の場合：指定時間範囲内は、同じ Target イオンの MS／MS 測定を行っていれば 1 個の成分に関する測定とみなして Group 化します。 入力値は、0－180（sec） Exclude Limit の場合：Include とは逆に、指定時間内、同じ Target イオンの MS／MS 測定データがない場合は、その前後の MS／MS データは別 Group と判断して、Grouping 処理します。 入力値は、0～180（sec） Grouping All MS/MS Event：チェックマークをつけた状態にすると、同じ Target イオンに対して異なる Event で MS/MS 測定を行ったデータも Grouping 処理します。
MS／MS TIC Peak Detection	チェックマークをつけた状態にすると、Grouping 処理を行った結果の TIC 上で、複数のピークが観測される場合にこれを分割する Grouping 処理を行います。質量数の近いイオンで、成分としては異なるピークが最初の Grouping で同じ Group に判定されるような近い時間に観測されるような場合に使用します。 通常は Off の状態で、Grouping を行っていただき、結果、Group に分けられた各 TIC 上で、更に複数のピークが観測されているような場合にのみ使用します。
Display Sort Option for MSn Group	Grouping 結果の表示設定。 Retention Time の場合：Grouping 結果を Retention Time 順に表示します。 Precursor Ion m／z の場合：Grouping 結果を Target イオンの質量数（m／z）順に表示します。

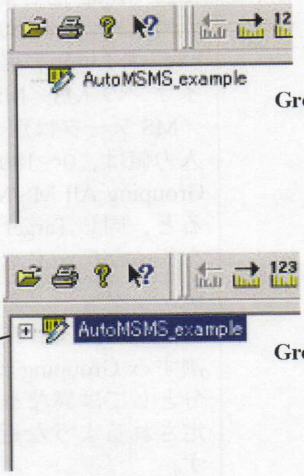
項　　目	説　　　明
Export Option for Grouping Result	Grouping 結果から Target イオンのリスト(Precursor Ion List)を出力するか指定します。Precursor Ion List を出力する場合は [Browse ...] ボタンをクリックし、保存先のフォルダとファイル名称を指定してください。Precursor Ion List はメニューの [Export Precursor Ion List ...] からも出力できます。
MS2 Group Only All	Precursor Ion List に出力する情報を指定します。MS2 Group Only の場合：MS／MS の Target イオン情報のみ出力します。 All の場合：MS^3 以上を含む Target イオン情報を出力します。
Calculate Mass and Charge of Precursor Ion	Precursor Ion List に価数を出力するか指定します。チェックマークをつけた状態にすると、Target イオンの価数を出力します。

(3) 設定を完了後、[OK] ボタンをクリックしてください。Grouping 処理が行われます。

(4) Grouping 処理中は、下記のダイアログボックスが表示されます。
処理が完了すると、ダイアログボックスが消えて、画面左側のグルーピングウィンドウのデータ名称がツリー表示に変わります。＋マークをクリックすると、Grouping されたデータのツリーが表示されます。



Grouping 処理中メッセージ



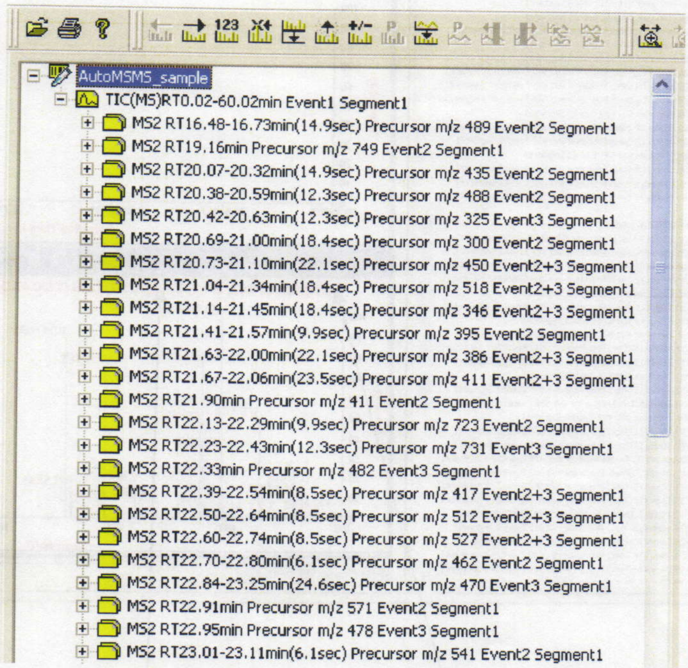
Grouping 処理前

Grouping 処理後

[＋] が表示されます。クリックすると
Grouping されたデータのツリーが表示されます。

Grouping 処理中の画面

ツリーは、Retention Time にチェックを入れた場合は測定開始からの時間の順番で表示され、同じ Target イオンの MS／MS データをまとめてグループ化してあります。Precursor Ion m／z にチェックを入れた場合は親イオンの質量数順で表示されます。各フォルダの TIC とマススペクトルをそれぞれダブルクリックするだけで表示することができます。

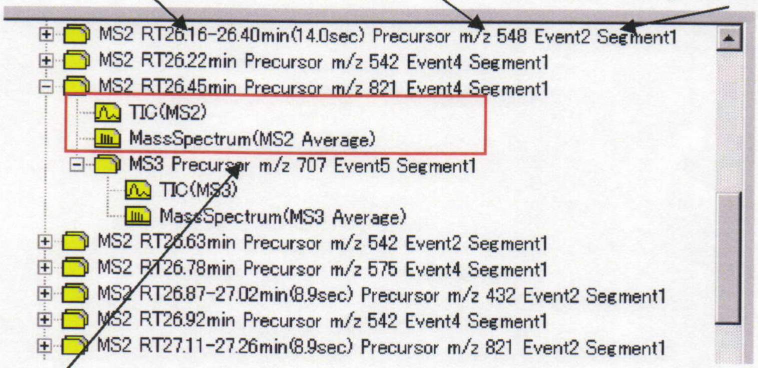


グルーピング結果例

Grouping したデータの時間範囲を示します。

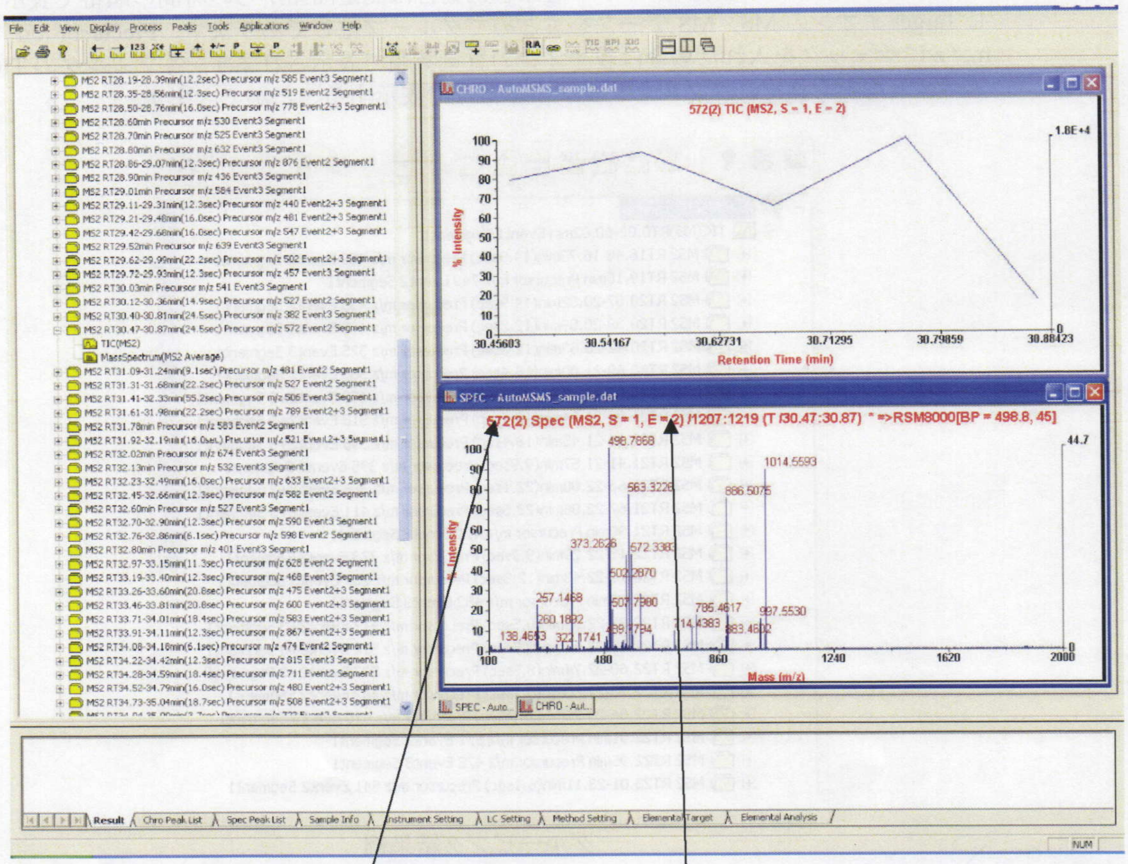
MS／MS 測定時の Target イオン質量数を示します。

測定時の Segment、Event 番号を示します。



グルーピング表示の説明

ダブルクリックすることで、TIC、マススペクトルデータが表示されます。



Target イオン質量数を示します。　　　測定時の Segment、Event 番号を示します。

TIC、マススペクトル表示例

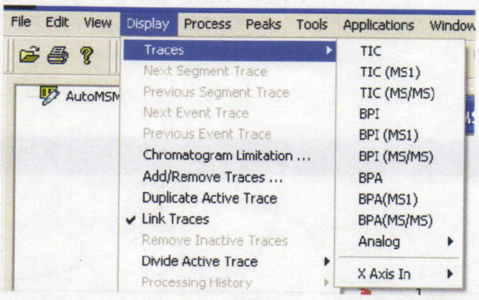
2-2 MS、MS／MS のデータを個別に表示させる方法

Auto MS など、MS と MS／MS 測定が混在したデータでデータを開いた状態では、MS と MS／MS など異なる条件のデータが一緒になってクロマト表示されます。このまま範囲指定を行ってマススペクトル表示を行うと、MS と MS／MS の混ざったマススペクトルが出力されます。

ここでは、MS のみのデータもしくは MS／MS のみのデータを選択的に表示させる方法を説明します。

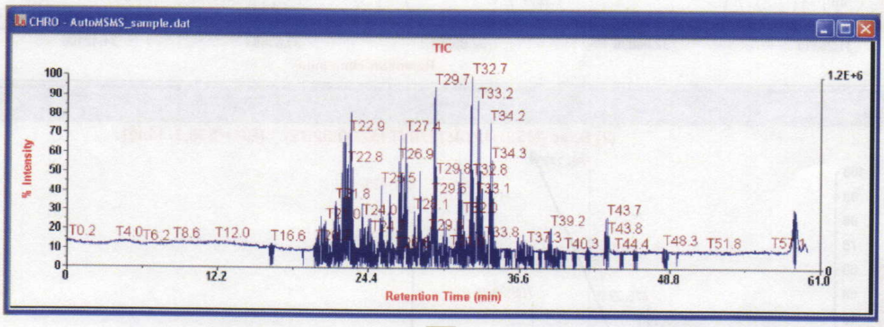
クロマトグラムウィンドウを選択してから、メニューの Display Traces をクリックするとメニューが表示されます。

この中から、TIC(MS1) もしくは BPI(MS1) を選択すると、MS データのクロマトグラムを表示することができます。

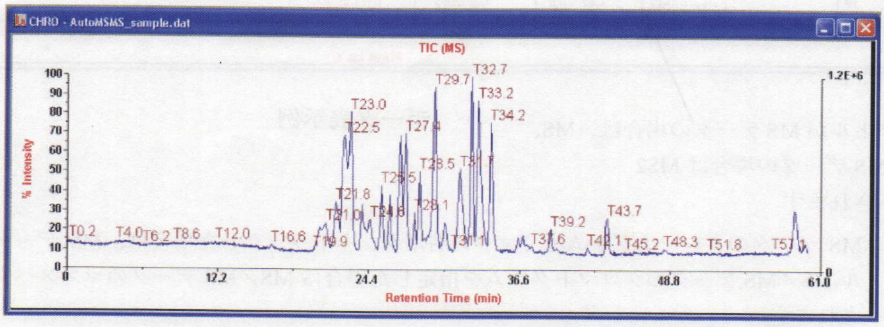


メニュー選択

■データを開いた時点の TIC



■MS データに限定した TIC



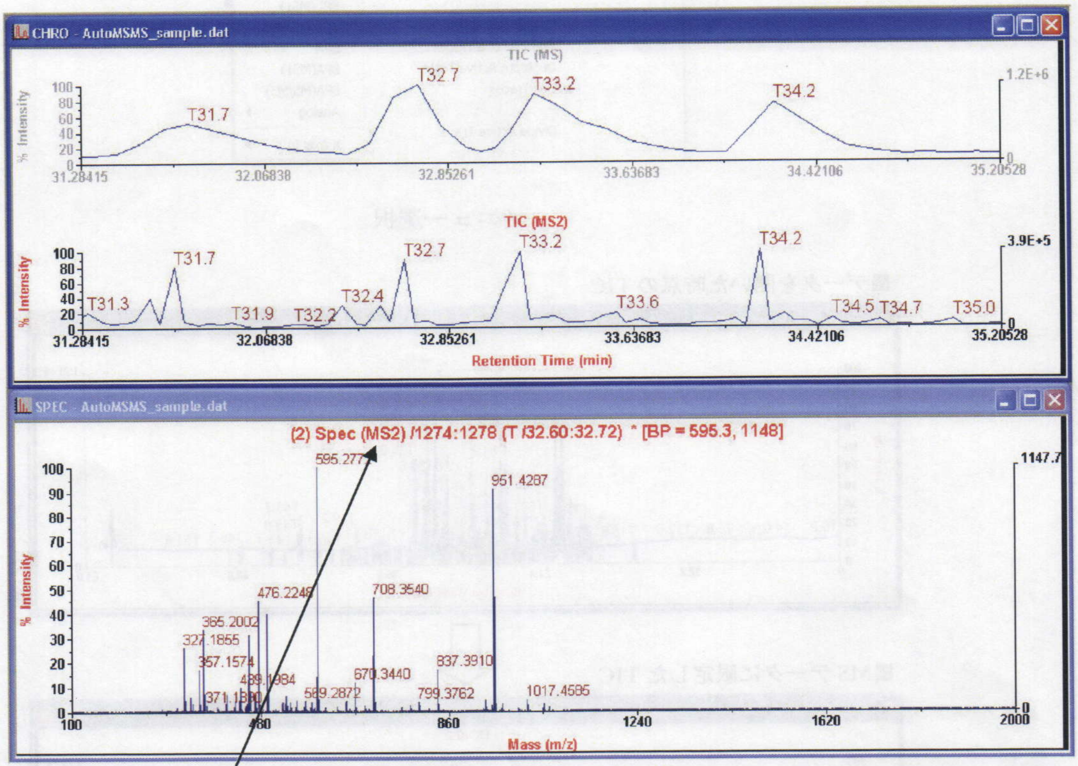
データ表示例

同様の操作で、TIC（MS1） の代わりに TIC（MS／MS） を選択すると、MS／MS データのみの TIC データや BPI データを選択することが可能です。

Display　Duplicate Active Trace 機能を使って、クロマトグラムを 2 段に表示させておき上段のクロマトグラムをクリックしてから、上記の操作で Display　Traces　TIC（MS1） を行って、MS データのみの TIC を上段のクロマトグラムとして表示させます。

次に下段のクロマトグラムをクリックしてから、Display　Traces　TIC（MS／MS） のように操作することで、ウィンドウ内に、MS の TIC と MS／MS の TIC を表示することができます。

下図に示すような状態にして、上段のクロマトグラムを範囲指定してマススペクトルを出力すると、MS データのスペクトル、下段の MS／MS データの TIC を指定してマススペクトル出力すると、MS／MS データのスペクトルを選択的に表示させることが可能です。



スペクトルが MS データの場合は、MS、MS／MS データの場合は MS2 と表示されます。

データ表示例

MS データのクロマトグラム上でマウス右ボタンをドラッグした場合は、MS データのスペクトル MS／MS データのクロマトグラムを指定した場合は MS／MS データのマススペクトルが表示されます。

2-5 mgf 変換の条件の確認

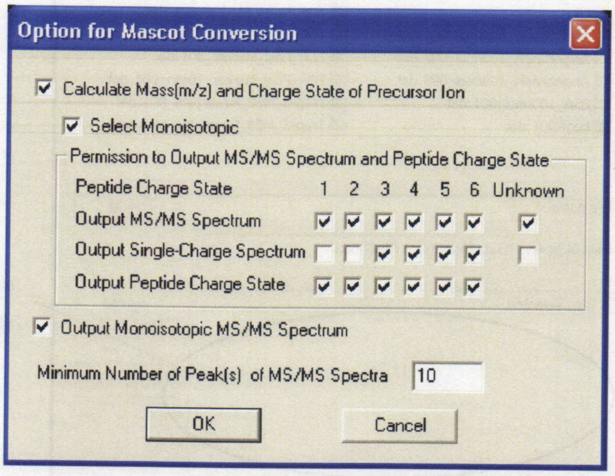
ここでは、Grouping 処理行った後に、Mascot 検索用のデータファイル（mgf）の作成を行います。

Mascot 検索用のデータファイルに保存する操作を行う前に、Grouping 処理などの条件設定を確認してください。処理条件の内容は、一度データを開いて、各パラメータを設定することでデータと一緒に保存されます。また条件を別ファイルとして保存しておくことも可能です。

(1) 処理を行う前の設定

実際に、データファイルを指定して、処理を行う前に、処理の条件についていくつか確認や設定を行います。

メニューの File Option for Mascot Conversion … を選択してください。



Option for Mascot Conversion ダイアログ

項　目	説　明
Calculate Mass (m／z) and Charge State of Precursor Ion	Precursor イオンのアベレージスペクトルによる質量数(m／z)と価数判定を行うか設定します。 On の場合、アベレージスペクトルから計算します。 Off の場合、測定時の質量数(m／z)を採用します。

項　目	説　明
Selected Monoisotopic	Precursor イオンのアベレージスペクトルから質量数(m／z)を求める際、モノアイソトピックピークを選択するか設定します。
Output MS／MS Spectrum	Precursor イオンの価数により、対応する MS／MS スペクトルを出力するかどうかを指定します。
Output Single-Charge Spectrum	Precursor イオンの価数により、対応する MS／MS スペクトルを出力する場合に、一価変換するか指定します。
Output Peptide Charge State	Precursor イオンの価数により、対応する MS／MS スペクトルを出力する場合に、価数の値を出力するかどうかを指定します。
Output Monoisotopic MS／MS Spectrum	MS／MS スペクトルのモノアイソトピックピークのみを出力するか指定します。
Minimum Number of Peak(s) of MS／MS Spectra	MS／MS スペクトルに含まれる最低ピーク本数を指定します。

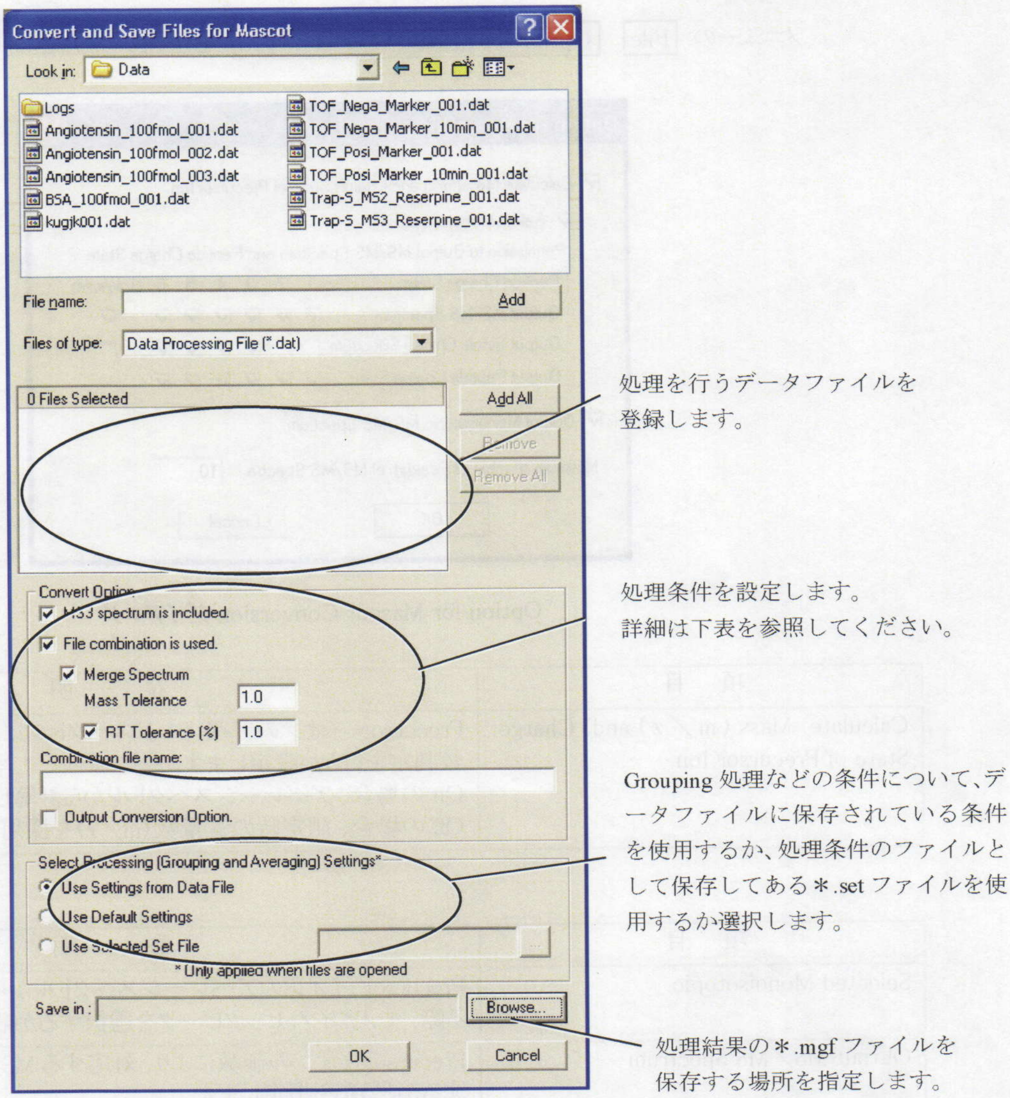
設定を確認して OK ボタンをクリックしてください。

(2) 処理操作

処理条件を確認したら、実際にデータを指定して、処理を行います。

メニューから、[File] [Convert And Save Files For Mascot ...] を選択してください。

ダイアログボックスが表示されますので、処理を行うデータファイルや処理結果の、＊.mgf ファイルを保存する場所などの指定を行ってください。

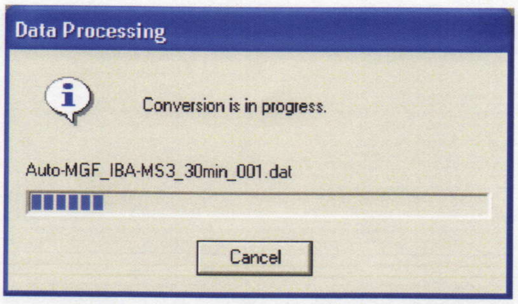


Mascot 変換条件ダイアログボックス

項　目	説　明
MS3 spectrum is included.	データファイルに MS^3 スペクトルが含まれているか指定します。 On の場合、MS^3 スペクトルを含めてアベレージスペクトルを作成します。 Off の場合、MS／MS スペクトルのみでアベレージスペクトルを作成します。
File combination is used.	複数のデータファイルを 1 つの MGF ファイルにするか指定します(最大 8 ファイル)。
Merge Spectrum	Precursor イオンの質量数(m／z)と価数の一致したスペクトルをマージするか指定します。
Mass Tolerance	スペクトルをマージする場合の質量数(m／z)の一致裕度を指定します。 入力範囲:0.1～2.0
RT Tolerance(%)	マージする条件として、保持時間を使用するか指定します。また、使用する場合の一致裕度を指定します。 入力範囲:0.5～10.0
Combination file name:	MGF ファイルの名称を指定します。
Output Conversion Option	MGF ファイル作成条件を出力するか指定します。

データの指定を完了したら、OK ボタンをクリックしてください。

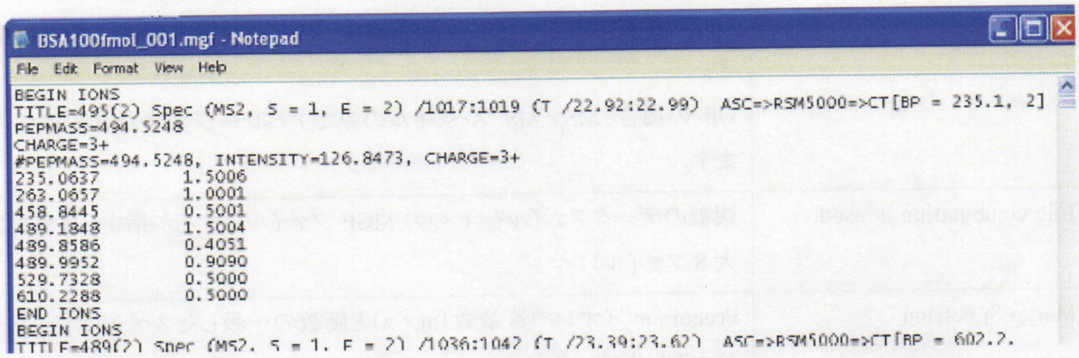
処理が行われます。処理中は、下記のメッセージが表示されます。メッセージが消えると処理完了です。



処理中メッセージ

ファイルの拡張子は Matrix Science 社のフォーマットにあわせて Mascot generic file format (mgf)になります。

作成が終了すると下段のアウトプットウィンドウに MS2 スペクトルを mgf に変換した数が表示されます。作成された mgf の内容は下記のようになります。（mgf はワードパッドやノートパッドで開くことが可能です。）



```
BSA100fmol_001.mgf - Notepad
File Edit Format View Help
BEGIN IONS
TITLE=495(2) Spec (MS2, S = 1, E = 2) /1017:1019 (T /22.92:22.99)  ASC=>RSM5000=>CT[BP = 235.1, 2]
PEPMASS=494.5248
CHARGE=3+
#PEPMASS=494.5248, INTENSITY=126.8473, CHARGE=3+
235.0637        1.5006
263.0657        1.0001
458.8445        0.5001
489.1848        1.5004
489.8586        0.4051
489.9952        0.9090
529.7328        0.5000
610.2288        0.5000
END IONS
BEGIN IONS
TITLE=489(2) Spec (MS2, S = 1, E = 2) /1036:1042 (T /23.39:23.62)  ASC=>RSM5000=>CT[BP = 602.2,
```

＜mgf ファイルに含まれる情報＞

・ BEGIN IONS： 個々の MS/MS データの開始

・ TITLE＝～ ： MS/MS スペクトルが属するクロマトグラムの情報

・ PEPMASS： MS/MS 測定時の親イオンの m/z

・ CHARGE： MS/MS 測定時の親イオンの価数

・ ＃PEPMASS=～： PERMASS の値を元に測定データから再計算した親イオンの m/z、強度、価数

・ 235.0637　　1.5006 ： 上記の親イオンの MS/MS で検出された各フラグメントの m/z、強度

〜

610.2288　　0.5000

・ END IONS： 個々の MS/MS データの終了

<装置の停止>

日常的な装置の停止は、以下の手順で行います。※真空は停止しません。

・ nanoLC の各ポンプを Conditioning Window より Off にします(送液継続の場合は不要)。

・Auto Sequence コントロールパネルから LC を Disconnect することにより、LC コントロールパネルを Close します。

・Auto Sequence コントロールパネルを閉じる(このとき MS コントロールパネルも自動的に閉じます。

・PC 電源を Shutdown します。

3. 測定結果を用いたマスキャリブレーションの手順

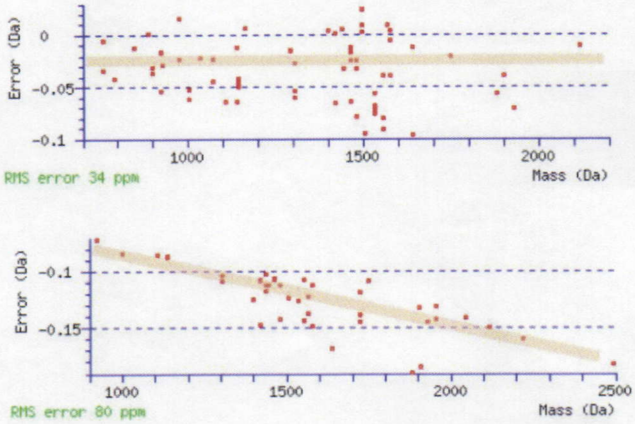
TOF/MS ではイオンが真空管を飛行する時間の差で質量差を算出している性質上、温度変化やTOF 部のパラメータが変更された場合、マス軸がずれる可能性があります。マス軸が大きくずれますと、タンパク質同定結果に影響を与えるので定期的に標準サンプルでのマス軸のチェックが必要です。

もし、マス軸がずれた状態でタンパク質の同定を行う場合には、質量数のトレランス(X 章参照)を大きくしないとタンパク質がヒットしません。そこでトレランスを大きくした場合、質量数がずれているにも関わらず、タンパク質があたる可能性があり、同定結果の信頼性が下がります。そのためキャリブレーションを行う必要があります。

取扱説明書ではμESI にしてキャリブレーションマーカーを使用しキャリブレーションを行うことを推奨しております。しかし、NanoESI を使用時にシステムを変更せずにキャリブレーションを行いたい場合は、NanoESI にて測定したサンプルの測定結果からでもキャリブレーションを行うことが可能です。ただし、この方法でキャリブレーションを行うには確実に目的ピークが同定されていることが前提となります。

3.1 キャリブレーションを行うためのペプチド鎖の選択

Mascot をもちいて検索したデータを確認します。Mascot の検索結果画面から ProteinView を開くと右図のようなグラフが表示されます。右図はマス軸ずれの事例を示してます。上は平均して－0.05～0Da のずれですが、下では－0.15～-0.1Da とずれが大きくなっています。このような場合にはデータの信頼性を上げるためにキャリブレーションを行います。

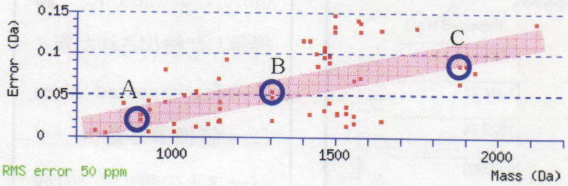


マス軸ずれの例

上図のマス軸ずれを示す図は－方向、＋方向ともにどちらかにずれている傾向はありませんが、下の図では高マス側に行くに従い質量数のずれが－方向に大きくなっており、マス軸がずれていることがわかります。また左のずれを示す軸の拡大率に注意してください。

実際の検索結果(下図)をもとにキャリブレーションを行います。

	347 - 359	784.44	1566.87	1566.74	0.14	0	K.DAFLGSFLYEYSR.R	(Ions score 55)
	360 - 371	480.64	1438.90	1438.80	0.10	1	R.RHPEYAVSVLLR.L	(Ions score 16)
	375 - 386	752.81	1503.60	1503.57	0.03	0	K.EYEATLEECCAK.D	(Ions score 45)
	375 - 386	752.81	1503.60	1503.57	0.03	0	K.EYEATLEECCAK.D	(Ions score 45)
	387 - 399	519.22	1554.65	1554.63	0.02	0	K.DDPHACYSTVFDK.L	(Ions score 10)
	387 - 399	519.23	1554.65	1554.63	0.03	0	K.DDPHACYSTVFDK.L	(Ions score 28)
	387 - 399	519.24	1554.70	1554.63	0.07	0	K.DDPHACYSTVFDK.L	(Ions score 19)
	402 - 412	435.92	1304.73	1304.71	0.02	0	K.HLVDEPQNLIK.Q	(Ions score 20)
B	402 - 412	653.38	1304.76	1304.71	0.05	0	K.HLVDEPQNLIK.Q	(Ions score 44)
	402 - 412	435.93	1304.76	1304.71	0.05	0	K.HLVDEPQNLIK.Q	(Ions score 12)
	421 - 433	740.45	1478.88	1478.79	0.09	0	K.LGEYGFQNALIVR.Y	(Ions score 54)
	421 - 433	740.45	1478.88	1478.79	0.10	0	K.LGEYGFQNALIVR.Y	(Ions score 46)
	437 - 451	547.32	1638.95	1638.93	0.02	1	R.KVPQVSTPTLVEVSR.S	(Ions score 47)
	437 - 451	820.54	1639.06	1638.93	0.13	1	R.KVPQVSTPTLVEVSR.S	(Ions score 14)
A	483 - 489	450.25	898.48	898.46	0.02	0	R.LCVLHEK.T	(Ions score 33)
	483 - 489	450.25	898.48	898.46	0.03	0	R.LCVLHEK.T	(Ions score 33)
	499 - 507	570.75	1139.48	1139.46	0.02	0	K.CCTESLVNR.R	(Ions score 62)
	499 - 507	570.77	1139.53	1139.46	0.07	0	K.CCTESLVNR.R	(Ions score 41)
	508 - 523	627.99	1880.96	1880.90	0.06	0	R.RPCFSALTPDETYVPK.A	(Ions score 16)
	508 - 523	628.00	1880.98	1880.90	0.09	0	R.RPCFSALTPDETYVPK.A	(Ions score 11)
	548 - 557	381.58	1141.72	1141.71	0.02	1	K.KQTALVELLK.H	(Ions score 23)
	548 - 557	381.58	1141.73	1141.71	0.02	1	K.KQTALVELLK.H	(Ions score 34)
	548 - 557	571.88	1141.74	1141.71	0.03	1	K.KQTALVELLK.H	(Ions score 46)
	548 - 557	571.88	1141.75	1141.71	0.04	1	K.KQTALVELLK.H	(Ions score 59)
	569 - 580	700.41	1398.80	1398.69	0.12	0	K.TVMENFVAFVDK.C	(Ions score 11)
C	581 - 597	644.28	1929.82	1929.74	0.08	1	K.CCAADDKEACFAVEGPK.L	(Ions score 39)
	588 - 597	554.76	1107.50	1107.49	0.01	0	K.EACFAVEGPK.L	(Ions score 40)
	598 - 607	501.80	1001.58	1001.58	0.01	0	K.LVVSTQTALA.-	(Ions score 35)
	598 - 607	501.80	1001.59	1001.58	0.01	0	K.LVVSTQTALA.-	(Ions score 38)



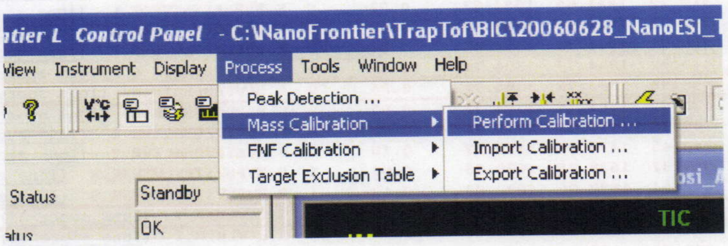
Mascot の ProteinView の抜粋

Mascot の結果から、マス軸が高質量数になるにつれずれ幅が大きくなることがわかります。ピンクの線が Mascot の実測値から推測したマス軸です。キャリブレーションは 3 点以上で行うと正確に行うことができるので今回は、上記の ABC の親イオンを使用してキャリブレーションを行います。

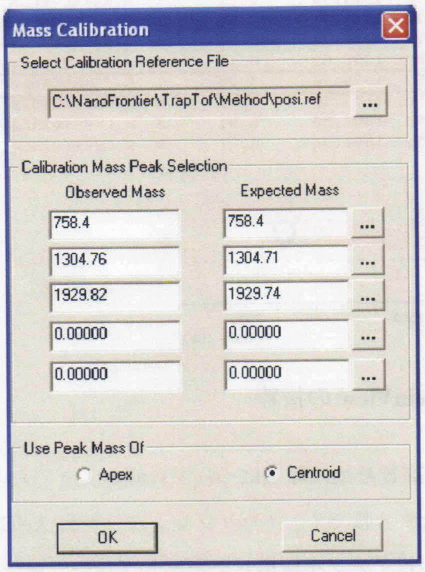
	検出された親イオン (一価換算したとき)	データベース上の親イオン (一価換算したとき)
A	898.48	898.48
B	1304.76	1304.71
C	1929.82	1929.74

3.2 マスキャリブレーション

上記の三点を使用してキャリブレーションを行います。測定を行った装置のコントロールパネルで、[Process]−[Mass Calibration]−[Perform Calibration]を選択します。



新しく開いた Mass Calibration ダイアログに、3.1 の Mascot 検索結果から選択したペプチドの質量数を入力し、OKを選択します。



Observed Mass に一価換算した検出された親イオンを、Expected Mass に一価換算したデータベース上の親イオンの理論値を入力します。

以上の操作により、NanoESI での結果を元に TOF のキャリブレーションができます。

＜nanoLC／MS 測定時の注意点＞

① トラップカラムに前回測定時のサンプルが残存し、次のサンプル測定時にコンタミする場合があります。このようなペプチド成分の除去には、有機溶媒で長時間カラムを洗浄するよりもブランク溶媒(0.1%ギ酸 or 初期移動相)をサンプル代わりに注入し、グラジエント溶出させる方が有効なケースがよくあります。また場合によっては、異なるサンプルの測定間にブランク測定を入れることも考慮する必要があります。

② イオン化状態の調整は非常に重要となります。中でもチップの位置はイオン化効率に大きく影響します。また、チップの位置は、使用されるチップのロット、移動相、流量に依存します。NanoESI の場合 nanoLC と接続した状態で使用しますので、μESI での調整時に用いる標準サンプル等での調整は難しくなります。通常使用されるギ酸添加の移動相では、m/z445 などのいくつかのピークがバックグラウンドとして検出されます(次頁参照)。このようなピークを基準としてチップ位置・Spray Potential・Counter Gas Flow といったイオン化パラメータを調整した後、標準的なペプチドやタンパク消化物(弊社ラボでは KYA 社の BSA トリプシン消化物を使用しています)で感度確認を行います。チップと API との距離が短い場合は比較的低い Spray Potential でイオン化は安定しますが、距離が長い場合はより高電圧で安定化する傾向があります。

③ 多量のペプチドが含まれているサンプルの場合、イオンサプレッションやスキャン回数の影響によりタンパクヒット数やカバー率が減少する場合があります。この場合、グラジエントの傾きを緩やかにすることによりペプチド成分がより分離され易くなり、改善されることがあります。特にイオンサプレッションの影響を軽減するには有効な手段となります。

④ nanoESI のチップは、先端の穴径が 10μm 前後と非常に細く絞り込まれているために、使用に伴って徐々にチップの先端形状が変形し、イオン化効率が徐々に減衰する傾向があります。これはイオン化時の高電圧の影響によるものであるため、チップを長期間安定して使用するためには Spray potential を過度に高くしないように注意してください。

Common Background Ions for Electrospray

(Positive Ion)

m/z	Ion	Compound
101	$(M+Na)^+$	DMSO
102	$(M+H)^+$	triethylamine (TEA)
104/106	$(M+Cu)^+$	acetonitrile
105	$(2M+Na)^+$	acetonitrile
120	$(M+Na+CH_3CN)^+$	DMSO
122	$(M+H)^+$	Tris
123	$(M+H)^+$	dimethylaminopyridine (DMAP)
130	$(M+H)^+$	diisopropylethylamine (DIPEA)
137	$(M+ACN+NH_4)^+$	DMSO
144	$(M+H)^+$	tripropylamine (TPA)
145/147	$(2M+Cu)^+$	acetonitrile
146	$(3M+Na)^+$	acetonitrile
150	$(M+H)^+$	phenyldiethylamine
153	$(M+H)^+$	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU)
157	$(2M+H)^+$	DMSO
159	$(M+Na)^+$	sodium trifluoroacetate
179	$(2M+Na)^+$	DMSO
186	$(M+H)^+$	tributylamine
214		Unknown surfactant
217		Unidentified contaminant
225	$(M+H)^+$	dicyclohexyl urea (DCU)
231	$(M+NH_3)^+$	Unknown†
239/241	$[(M.HCl)2-Cl]^+$	triethylamine
242	M+	tetrabutylammonium $(C_4H_9)_4N^+$
243	M^+	trityl cation
257	$(3M+H)^+$	DMSO

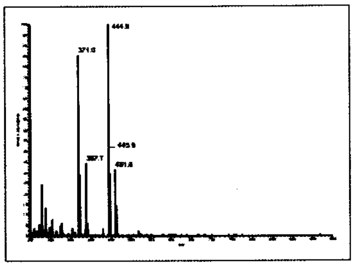
m/z	Ion	Compound
267	$(M+H)^+$	tributylphosphate
273	M^+	monomethoxytrityl cation (MMT)
279	$(M+H)^+$	dibutylphthalate (plasticiser)
282		plasticizer in polyethylene
301	$(M+Na)^+$	dibutylphthalate (plasticiser)
317	$(M+K)^+$	dibutylphthalate (plasticiser)
336	$(M+H)^+$	tributyl tin formate
338	$(M+H)^+$	erucamide
360	$(M+Na)^+$	erucamide
371	**$(M+H)^+$**	**polysiloxane, followed by 388**
391	$(M+H)^+$	diisooctyl phthalate (plasticiser)
413	$(M+Na)^+$	diisooctyl phthalate (plasticiser)
425	$(M+Na)^+$	unidentified contaminant (plasticiser)
429	$(M+K)^+$	diisooctyl phthalate (plasticiser)
445	**$(M+H)^+$**	**polysiloxane, followed by 462**
449	$(2M+H)^+$	dicyclohexyl urea (DCU)
454	$(M+Na+CH_3CN)^+$	diisooctyl phthalate (plasticiser)
522		Unknown†
550		Unknown†
798	$(2M+NH_4)^+$	diisooctyl phthalate (plasticiser)
803	$(2M+Na)^+$	diisooctyl phthalate (plasticiser)

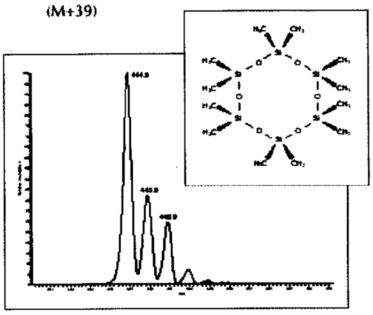
PEG polymers exhibit peaks 44 amu apart

Common Adducts:

$(M+NH_4)^+$ (M+18)
$(M+Na)^+$ (M+23)
$(M+K)^+$ (M+39)

Common nanospray background of 50% ACN, 0.1% Formic Acid*





† Derived from rubber tip from disposable syringe plunger

* See Andreas Schlosser and Rudolf Volkmer-Engert "Volatile polydimethylcyclosiloxanes in the ambient laboratory air identified as source of extreme background signals in nanoelectrospray mass spectrometry", *J. Mass. Spectrom.* 2003; 38: 523-525 for more information on these common background ions.

The information contained in this document is believed reliable and accurate; however, nothing set forth herein constitutes a warranty or representation of any kind or nature. ©2004 New Objective, Inc. All rights reserved.

参考資料:nanoESI のバックグラウンドイオンリスト(正イオン化)

＜Newobjective 社ホームページより＞